
ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

DU RÔLE DES LEUCOCYTES DANS L'INFECTION DIPHTÉRIQUE

PAR G. GABRITSCHESKY.

(Travail du laboratoire de M. METCHNIKOFF, à l'Institut Pasteur.)

Les nombreuses observations faites jusqu'à présent ont déjà bien établi la relation étroite qui existe dans chaque maladie infectieuse entre les germes infectieux et les cellules amiboïdes de l'organisme. Cette relation est mise en évidence par le fait qu'à chaque infection correspond une réaction leucocytaire déterminée ; cette réaction est suivie par l'évolution de la phagocytose qui est également soumise aux lois qui lui sont inhérentes. Ces réactions cellulaires ont été prouvées même dans les maladies infectieuses où l'intoxication se manifeste au premier plan, de sorte que l'on était porté à croire que les leucocytes n'y étaient pour rien. Après les travaux de MM. *Vaillard et Vincent* (1) sur le tétanos, et ceux de M. *Cantacuzène* (2) sur le choléra, pour ne pas citer les autres, il ne peut y avoir aucun doute que toutes les conditions qui empêchent ou retardent la réaction leucocytaire de l'organisme sont en même temps celles qui favorisent le développement des germes infectieux et la production du poison spécifique par ces derniers. Je ne crois pas devoir entrer dans de plus amples détails, trop connus de ceux qui ont étudié la question de l'immunité, et j'aborderai directement l'exposé de mes propres observations sur la diphtérie — cette maladie toxique par excellence — qui se distingue, avant tout, par certaines particularités de la réaction leucocytaire de l'organisme.

Pour mieux comprendre ces particularités, il faut se rappeler

que nous avons plusieurs types de réactions leucocytaires dans les maladies infectieuses. Le plus répandu, c'est la leucocytose dans la pneumonie fibrineuse, où la quantité des leucocytes est en proportion directe avec l'intensité de l'infection, de sorte que l'absence de la leucocytose pendant la maladie nous autorise à penser que, pour une raison quelconque, l'organisme est privé des moyens naturels de se défendre contre l'envahissement des germes infectieux, et, plus le nombre des leucocytes diminue, plus le pronostic devient difficile. Ce fait peut être considéré comme prouvé après les récents travaux de MM. Kikodze (3), Iaksch (4), Rieder (5) et Tchistowitseh (6). Dans quelques autres maladies, la fièvre typhoïde et la rougeole, par exemple, le nombre des leucocytes n'est ordinairement pas augmenté, et dans la fièvre typhoïde leur nombre est même diminué. Il résulte donc que, dans les deux cas précités, la leucocytose indique une marche anormale de l'infection et des complications dues pour la plupart à des infections secondaires. C'est pour cette raison que le pronostic en serait relativement défavorable.

Nous verrons plus loin que la marche de la leucocytose dans la diphtérie ne correspond pas aux types ordinaires, et qu'à côté de la leucocytose générale du sang, il faut distinguer encore la leucocytose locale qui se manifeste par l'infiltration purulente et la formation du pus. Si, dans la majorité des cas, la première précède la seconde, ou si les deux surgissent parallèlement, cette règle n'est pas applicable à un certain nombre de maladies infectieuses. Nous savons avant tout que les animaux immunisés, et naturellement réfractaires contre certains virus, peuvent réagir avec une moins grande leucocytose générale que les animaux non immunisés et sensibles aux mêmes virus, et néanmoins la leucocytose locale et la phagocytose non seulement ne sont pas moins développées, mais elles sont même plus accusées. Au point de vue de la chimiotaxie, tous ces faits peuvent être facilement expliqués, et chaque cas d'infection devra être étudié sous ce double rapport.

C'est précisément le problème que nous nous sommes posé en étudiant la diphtérie, d'autant plus que dans cette direction aucune recherche n'avait encore été faite. En outre, nous avons recueilli quelques observations qui pourront être utiles pour déterminer le rôle de la phagocytose dans la diphtérie.

J'ai eu l'occasion d'étudier la leucocytose sur des enfants diphtériques, à l'hôpital, et sur des lapins, au laboratoire. Grâce à l'extrême obligeance de M. Roux, j'ai pu suivre les malades soumis au traitement par le sérum antitoxique. Tous les détails de ce traitement ont été publiés par M. Roux, et je me bornerai à observer que les propriétés de ce sérum sont telles, qu'il suffit de 1/500,000 de centimètre cube pour qu'un cobaye d'une taille moyenne soit immunisé contre la dose mortelle minima.

Les recherches bactériologiques faites par M. Martin ont porté sur les 10 cas de diphtérie constatés à l'hôpital des Enfants-Malades; d'après ces indications bactériologiques, nous avons noté si les malades étaient atteints ou non de diphtérie bacillaire, sans tenir compte des complications infectieuses.

Je profite de la présente occasion pour témoigner à MM. Roux et Martin ma profonde gratitude pour les indications nécessaires à mon travail qu'ils ont bien voulu me donner. Les quatre autres cas de diphtérie que j'ai observés à l'hôpital Trousseau n'ont pas été traités par le sérum. Dans ces cas, j'ai fait moi-même le diagnostic bactériologique.

On verra dans l'Appendice que l'analyse du sang de ces malades a donné les résultats suivants :

1^o Dans les 8 cas de diphtérie suivis de guérison, après chaque injection sous-cutanée de sérum (10 ou 20 c. c), le nombre des leucocytes du sang, qui, ordinairement, est augmenté au début de la maladie, et qui oscille dans nos cas entre 11,450 et 25,000, s'abaisse ensuite progressivement jusqu'au chiffre normal. La même diminution progressive de la leucocytose a été observée dans les deux cas où le sérum n'a pas été injecté, mais qui, également, ont été suivis de guérison ;

2^o Dans les 3 cas de diphtérie à issue mortelle, le nombre des leucocytes du sang a été considérablement plus grand, et il oscillait entre 29,500 et 51,000 ;

3^o Dans un cas (ix), où le malade à l'agonie était dans un état d'asphyxie, et où, par suite d'une brusque élévation du nombre de leucocytes (de 12,500 à 37,500), dans l'espace de 5 heures après l'injection du sérum, je m'attendais, par analogie avec le viii^e cas, à une issue mortelle, le malade a guéri après la trachéotomie. L'analyse bactériologique a démontré que ce croup n'était pas d'origine diphtérique.

Au sujet de notre première conclusion nous ferons remarquer que le nombre des leucocytes était déterminé 1^h 1/2, 2, 5, 7, 16 et 24 heures après l'injection de sérum, et que dans tous les cas, sans exception, la leucocytose avait diminué; donc, pour la guérison de la diphtérie, il n'est pas nécessaire que la leucocytose générale soit augmentée, et cette augmentation donne, au contraire, un mauvais pronostic.

En général, nous avons obtenu les mêmes résultats, dans nos expériences sur les lapins soumis à la sérumthérapie. En examinant les 2 tables de l'appendice (B), qui s'y rapportent, nous pourrions nous convaincre que la leucocytose atteint progressivement son maximum quelques heures avant la mort; c'est ainsi que chez les 2 lapins qui n'avaient pas reçu d'injection de sérum, le nombre des leucocytes du sang a atteint 26,000 à 36,000; chez les 2 lapins ayant reçu 0,5 de sérum chacun, l'un 7 heures après l'injection, et l'autre à deux reprises, la première 7 heures après et la seconde 3 jours après l'injection, la leucocytose s'est manifestée par son maximum de 29,900 à 35,000. 3 lapins ayant survécu à la dose mortelle de culture diphtérique n'ont pas eu, pendant la durée de la maladie, plus de 17,900, 15,000 et 19,000, c'est-à-dire, approximativement les mêmes chiffres que dans les cas de diphtérie humaine terminés par la guérison. En comparant la leucocytose diphtérique humaine à celle des lapins, nous constatons une différence insignifiante. Chez les enfants malades convalescents, nous observons toujours la diminution progressive de la leucocytose qu'ils avaient ordinairement en entrant à l'hôpital; chez les lapins traités par le sérum, 7 heures après l'inoculation du virus, la leucocytose n'est pas diminuée, ce qui pouvait dépendre, dans le cas donné, soit de la dose insuffisante du sérum, — d'autant plus que chez un lapin ayant guéri après la deuxième injection du sérum le nombre des leucocytes est tombé de 12,000 à 8,200, — soit d'autres causes.

Pour expliquer la marche de la réaction leucocytaire pendant la diphtérie, il était nécessaire de déterminer encore l'influence du sérum sur l'organisme non infecté. Dans ce but nous avons fait une expérience sur deux lapins immunisés par 0,5 c. c. de sérum, et sur deux lapins témoins, non immunisés. Ainsi qu'il ressort de la table B. III, on voit que, pendant 24 heures, le maximum des leucocytes du sang des animaux immunisés a

été de 11,500-18,500, tandis que chez les témoins, le maximum n'était que de 9,800 à 10,800. Nous ne savons pas quelle influence exerce chez les enfants l'injection préventive du sérum sur le chiffre des leucocytes du sang, mais chez les lapins le sérum peut augmenter leur nombre dans les premières 24 heures.

L'observation clinique et les expériences faites sur les animaux nous permettent d'affirmer que la leucocytose générale pendant la diphtérie suit une marche diamétralement opposée à celle de la leucocytose de la pneumonie fibrineuse; dans le premier cas, la leucocytose progressive se termine par la mort et dans le second cas, cette leucocytose annonce une issue favorable. Pour expliquer cette différence de la réaction leucocytaire générale dans ces deux maladies, il faut avant tout connaître que, dans la diphtérie, nous avons affaire principalement à une intoxication, et, dans la pneumonie fibrineuse, à une infection, de sorte que la leucocytose modérée existant au début de la diphtérie peut être suffisante pour provoquer la leucocytose locale et ensuite la phagocytose qui détruit le producteur même du poison. Il ne faut pas juger d'après la leucocytose générale les phénomènes locaux de l'infection, comme nous allons le démontrer.

II

Une série de faits montrent la réaction cellulaire locale et la phagocytose sur des parties atteintes de processus diphtérique et dans le pus des animaux.

M. *Löffler* (7) signale, dans son premier travail sur la diphtérie, l'apparition des phagocytes autour de l'endroit des injections sous-cutanées de culture.

D'après les recherches de M. *Ruffer* (8), on rencontre des phagocytes dans les membranes diphtériques de l'homme. M. *Ruffer* pense que si les bacilles diphtériques restent à la surface de la membrane sans pénétrer dans les parties profondes des tissus, c'est parce que les leucocytes sont un obstacle naturel à cette infiltration, en détruisant et en digérant les bacilles.

M. *Lubarsch* (9) a fait plusieurs observations sur la phagocytose dans l'infection diphtérique. Très intéressante est la con-

statation de ce fait que la phagocytose est d'autant plus accusée que la culture est plus virulente¹.

M. *Massart*, en 1892, a fait voir aussi que plus la culture diphtérique est virulente, plus elle attire les leucocytes du sang des cobayes.

En 1894, M. *Bardach* (10) parle de la propriété purulente des bacilles diphtériques, et confirme l'observation de M. *Massart*. Les cultures vivantes du bacille diphtérique et son poison possèdent des propriétés chimiotaxiques positives, surtout chez les chiens, ensuite chez les cobayes, plus faibles chez les lapins. Ce savant a retiré du pus des cultures plus virulentes que celles qui étaient injectées, et comme les bacilles diphtériques étaient contenus dans des phagocytes, il en a conclu que les derniers sont capables de détruire les bacilles les plus virulents.

Enfin, d'après le récent travail de M. *Kutscher* (11), on voit que les foyers broncho-pneumoniques sont dus aux bacilles diphtériques. A l'analyse microscopique, dans huit des neuf cas examinés, on a pu trouver les bacilles principalement dans les parties congestionnées des poumons; la plus grande partie des bacilles était contenue dans les phagocytes.

D'un autre côté, l'existence de la leucocytose locale, qui, comme l'on sait, précède la phagocytose, est démontrée par les recherches de MM. *Cornil* et *Rancier*, *Binault*, *Morel* (12) et plusieurs autres auteurs, d'après lesquelles on trouve, dans les amygdales de l'homme atteintes de processus diphtérique, une accumulation des leucocytes du sang.

Nous nous sommes bornés à étudier la phagocytose de la diphtérie expérimentale, parce que l'étude des phagocytes dans les membranes diphtériques des malades est accompagnée de tant de difficultés, que nous avons dû renoncer à en faire l'expérience; d'autre part, les recherches sur les phagocytes d'après les préparations anatomo-pathologiques nous privaient des moyens d'avoir affaire à des cas se terminant par la guérison, dans lesquels, comme nous supposons, l'étude de la phagocytose offre le plus d'intérêt. Nous nous sommes arrêtés aux expériences suivantes, espérant que de cette manière nous pourrions expliquer la corrélation entre la leucocytose du sang et la réaction cellulaire

1. Je regrette de n'avoir pas pu citer ce travail de M. *Lubarsch* d'après l'original.

locale. On immunise 3 ou 4 lapins, 24 heures avant l'expérience, avec 0,5 c. c. de sérum antitoxique, après quoi on injecte à ces lapins et aux 3 ou 4 lapins non immunisés, une épaisse émulsion de culture de bacilles diphtériques dans la chambre antérieure des yeux, après avoir retiré l'humeur aqueuse. Ensuite on détermine le nombre des leucocytes du sang après 1, 3, 8 et 24 heures, et, après chaque examen du sang, on fait l'énucléation des yeux infectés. On fixe les yeux enlevés dans une solution saturée de sublimé avec 2 0/0 d'acide acétique, et on les prépare pour les coupes d'après les règles ordinaires. C'est ainsi qu'on a pu observer la différence des réactions leucocytaires chez les animaux immunisés et ceux qui ne l'étaient pas.

Des tables ci-annexées (C. I.-II) on peut déduire ce qui suit :

1° La réaction leucocytaire générale (leucocytose du sang) est plus accusée chez les animaux non immunisés que chez les immunisés ;

2° La marche de la leucocytose est diverse dans ces deux cas : chez les lapins témoins, la leucocytose augmente progressivement ; chez les lapins immunisés, la leucocytose, après avoir atteint son maximum 8 heures après l'inoculation, disparaît au bout de 24 heures ;

3° Le degré de la leucocytose générale n'est pas proportionnel au degré de la leucocytose locale, c'est-à-dire d'émigration des leucocytes dans la chambre antérieure de l'œil et d'infiltration purulente du tissu de l'iris ;

4° L'émigration des leucocytes dans la chambre antérieure de l'œil commence déjà au bout d'une heure après l'infection, et peu de temps après apparaît la phagocytose ;

5° L'activité phagocytaire chez les lapins immunisés s'opère avec une plus grande énergie que chez les lapins témoins, de sorte qu'au bout de 8 heures il est impossible de constater, dans la chambre antérieure de l'œil des lapins immunisés, la présence des bacilles diphtériques libres (puisque'ils se trouvent tous contenus dans les phagocytes) ; tandis que chez les lapins non immunisés on peut observer, à côté de nombreux phagocytes, des cultures de bacilles diphtériques (voir la Pl. XIII) ;

6° Après 24 heures, la différence peut être encore plus accusée sous ce rapport. Dans deux expériences sur trois, faites sur des

lapins immunisés, on n'a pas trouvé du tout de bacilles au bout du dit laps de temps (C. II-III) ;

7° Le virus diphtérique est un poison nécrotisant ;

8° La différence du sort du bacille diphtérique dans l'organisme de ces deux catégories d'animaux, s'explique en partie par la nécrose plus rapide des leucocytes chez les animaux non immunisés. Déjà 8 heures après l'injection de l'œil de ces animaux, on peut constater la présence de beaucoup de leucocytes nécrosés, dont les noyaux désagrégés ont l'aspect de petites boules fortement colorées. 24 heures après l'infection, cette nécrose atteint le maximum de son évolution.

Ainsi, nous voyons que, dans l'infection diphtérique, l'activité phagocytaire des leucocytes est subordonnée aux lois établies par M. *Metchnikoff* ; toutefois il est à remarquer que dans cette infection la nécrose des leucocytes est très prononcée, et que par conséquent ils ne peuvent pas dans ces conditions terminer leur activité phagocytaire. MM. *Löffler*, *Roux* et *Yersin*, *Behring* et autres savants ayant étudié la diphtérie, ont constaté les propriétés nécrotisantes du virus diphtérique. M. *Oertel* (13) considère l'affection nécrobiotique des ganglions lymphatiques comme le trait caractéristique de la diphtérie humaine. Cet auteur affirme que le virus diphtérique se manifeste dans son action visible par la mort de cellules, principalement des leucocytes et des cellules plus grandes, rondes, qui l'ont recueilli. M. *Ch. Morel* a observé les mêmes phénomènes de la nécrose, mais il pense qu'ils étaient dus à l'infection secondaire par le streptococcus. Nos préparations microscopiques prouvent que les cultures diphtériques pures provoquent une si forte nécrose des tissus atteints que, 24 heures après l'injection dans la chambre antérieure de l'œil, nous avons pu constater une nécrose complète de la partie antérieure de l'œil, une fois chez un lapin immunisé et deux fois chez les lapins non immunisés.

L'action du sérum sur les animaux se manifeste par une plus grande résistance des éléments cellulaires au virus diphtérique, et c'est pour cela que la phagocytose peut donner chez les sujets immunisés des résultats meilleurs que chez ceux qui ne le sont pas. 3 heures après l'infection de l'œil, la phagocytose chez les sujets immunisés et non immunisés est à peu près la même. Les

bacilles sont englobés et en partie digérés par les cellules; mais de ce moment, sous l'influence de la toxine, les leucocytes des animaux non immunisés commencent à périr, et le bacille diphtérique commence à pousser librement dans l'œil, de sorte qu'au bout de 24 heures, chez les témoins, toute la surface antérieure et postérieure de l'iris est couverte d'une masse de bacilles, tandis que les leucocytes décomposés nous expliquent le développement progressif du bacille diphtérique. Si pendant nos expériences nous n'avions pas énucléé les yeux, l'infection dans les dits cas se serait terminée par la nécrose de l'œil, et les quelques bacilles, qui pourraient rester dans l'organisme des lapins non immunisés, en seraient éliminés au moyen de la séquestration de la partie infectée, comme cela a lieu pour la muqueuse, ainsi que nous le verrons plus loin. Cette sortie de l'organisme des parties infectées *in toto*, peut le sauver dans les cas où les phagocytes, luttant avec le germe infectieux, périssent en masse sans pouvoir le détruire. Le processus de la guérison dans la diphtérie est différent suivant l'endroit de l'infection. La destruction des bacilles diphtériques dans l'organisme même commence par la phagocytose, et se termine par la nécrose et la séquestration de la partie infectée; à la surface des muqueuses, au contraire, la nécrose précède la phagocytose; cette dernière peut être observée principalement dans la seconde période du processus, lorsque la séquestration s'est opérée, et que les globules du pus, s'ils ne sont pas nécrosés à leur tour, se trouvent en contact direct avec les bacilles.

Avant d'aborder l'exposé de nos dernières expériences avec les fausses membranes chez les cobayes, et de nous occuper de la phagocytose dans les dites conditions, il faut nous arrêter sur les propriétés bactéricides et antitoxiques du sérum, pour pouvoir expliquer jusqu'à quel point, dans l'infection diphtérique, la guérison peut être attribuée à ces facteurs chimiques.

Déjà M. *Behring* avait indiqué que le sérum immunisant ne détruit pas les bacilles diphtériques. Quelques auteurs avaient également confirmé cette absence de propriétés bactéricides du sérum, et, ainsi qu'il appert des pièces justificatives (D), j'ai eu aussi l'occasion de me convaincre que le sérum immunisant du sang et l'humeur aqueuse des lapins immunisés, non seulement

ne détruisent pas les bacilles, mais offrent même un milieu favorable à leur développement, et que leur virulence augmente dans ces conditions. On ne peut donc expliquer la diminution des bacilles diphtériques dans la chambre antérieure de l'œil des lapins immunisés, ni par les propriétés atténuantes, ni par les propriétés bactéricides des humeurs. En ce qui concerne la propriété antitoxique du sérum, elle ne pourrait non plus expliquer la disparition des germes infectieux dans l'organisme. Voilà pourquoi il est possible d'obtenir l'infection diphtérique locale, même chez les animaux immunisés.

Les faits ci-dessus exposés déterminent le rôle des leucocytes par rapport au bacille diphtérique et non à sa toxine. Ce côté de la question est une sphère nouvelle de recherches, et il existe des faits qui démontrent que la réaction leucocytaire par rapport aux substances vénéneuses d'origine animale et végétale est sujette à de propres lois, comme M. *Chatenay* (14) l'a récemment prouvé. Il est fort possible que certaines espèces de cellules mésodermiques mobiles de l'organisme possèdent la propriété d'accaparer non seulement des parcelles dures étrangères, ce qui se manifeste par la phagocytose, mais aussi de s'imbibier des substances liquides solubles et de les rendre inoffensives aux autres cellules de l'organisme : c'est ce que l'on pourrait appeler la *pinocytose*. Les recherches de M. *Kobert* et de ses élèves MM. *Samoïloff* (15), *Lipski* (16) et autres, sur l'absorption par les leucocytes et les cellules endothéliales des sels de fer et d'argent en solution, rendent cette supposition très probable. Toutefois, avant ces savants, j'avais réussi à démontrer qu'en injectant dans l'organisme des animaux des solutions de peptone et de glucose, les leucocytes du sang présentent quelques heures après la réaction glycogène que l'on n'observe pas avant l'expérience (17). J'ai émis la supposition que les leucocytes s'imbibent des solutions de peptone et de sucre, et qu'ils les transforment en une substance qui donne avec l'iode la réaction caractéristique. Je ne puis admettre que, dans le cas donné, je n'avais pas affaire aux phénomènes physiologiques vitaux, mais seulement au processus nécrobiotique du protoplasma des leucocytes, puisque la réaction se manifestait principalement dans des leucocytes neutrophiles et jamais dans les lymphocytes.

J'aborderai maintenant l'exposé de mes expériences sur les cobayes. A 2 cobayes, immunisés 24 heures avant l'expérience avec 0,3 c. c. de sérum, et à 4 cobayes neufs, on a cautérisé la muqueuse de la vulve avec un petit bâton de verre chauffé; après quoi la surface cautérisée a été infectée avec une culture virulente (dans du bouillon) de bacille diphtérique. Au bout de 25 heures, un des cobayes non immunisés était mort à la suite de l'infection diphtérique. Au bout de 36 heures, un cobaye immunisé et un autre non immunisé ont été tués, et les vulves infectées de diphtérie ont été enlevées et préparées pour les coupes.

68 heures après, on a tué une autre paire de cobayes, immunisé et non immunisé; le sixième cobaye est mort dans la nuit du 2^e au 3^e jour après l'infection. A l'analyse macroscopique, on a constaté chez tous les cobayes des membranes diphtériques plus ou moins formées; chez les animaux immunisés elles étaient moins accusées. Une plus grande différence a été constatée par rapport à l'œdème inflammatoire des tissus environnants, qui a été incontestablement plus accusé chez les cobayes non immunisés.

A l'analyse microscopique, on peut distinguer, dans les coupes transversales des vulves, au bout de 36 heures, des couches successives superposées dans l'ordre suivant : la couche de culture diphtérique, ensuite la couche du tissu nécrosé ne contenant pas de leucocytes, plus loin la couche des globules de pus, et enfin le tissu normal avec des vaisseaux hyperémiés et des petits épanchements sanguins; en comparant ces trois couches chez le cobaye immunisé et non immunisé, nous avons pu constater que la couche formée de globules de pus était plus épaisse chez le premier que chez le second cobaye.

La réaction leucocytaire locale est donc plus accusée chez le cobaye immunisé, ce qui correspond parfaitement au résultat obtenu dans les expériences sur les yeux des lapins. En outre, cette corrélation s'est manifestée dans l'état même des leucocytes qui sont généralement moins désagrégés chez les cobayes immunisés que chez ceux qui ne le sont pas.

Environ trois jours après l'infection, on observe que la fausse membrane est en grande partie détachée de l'organisme le long de la couche la plus infiltrée par les leucocytes. Ainsi, dans la

cavité de la vulve, on aperçoit les parties séquestrées de la muqueuse dans laquelle la pullulation de bacilles diphtériques se poursuit sans encombre. Les surfaces ulcérées de la vulve sont couvertes de globules de pus et de bacilles diphtériques. La différence entre le cobaye immunisé et non immunisé, à cette période du processus diphtérique, consiste dans le seul fait que les leucocytes du premier conservent toutes les propriétés des cellules vivantes, tandis que chez le cobaye témoin nous trouvons une masse de leucocytes désagrégés. Dans le premier cas, les bacilles ne pénètrent pas profondément dans le tissu, et sont arrêtés par les phagocytes à la surface de l'ulcère, tandis que, chez le cobaye non immunisé, ils pénètrent sans entraves dans les couches plus profondes.

Bien que généralement nous ayons rencontré peu de phagocytes, on en trouve cependant plus chez le cobaye immunisé qu'chez celui qui ne l'est pas.

Il résulte des faits cités que le processus de la guérison de la diphtérie des muqueuses doit se produire dans l'ordre suivant : réaction leucocytaire locale ; séquestration de la muqueuse infectée et nécrosée ; et ensuite activité phagocytaire des leucocytes défendant l'organisme contre les infections plus profondes et secondaires ; mais le principal procédé par lequel l'organisme se débarrasse des bacilles diphtériques, a un caractère purement mécanique aussitôt que la membrane s'est détachée. Il nous semble donc que la condition importante de la guérison du processus diphtérique local consiste, notamment, dans la formation rapide de l'inflammation circonscrite, et dans une grande accumulation des leucocytes, qui produisent l'histolyse. En l'année 1891, M. *Leber* (18) a de nouveau appelé l'attention sur le rôle des leucocytes dans la production de l'histolyse à l'aide des ferments digérants et dissolvants des tissus. Il ressort aussi des recherches tout récemment publiées par M. *Berestnew*¹⁹ que le sang même riche en globules blancs, comme celui des malades leucocythémiques, manifeste ce pouvoir au plus haut degré. Étant donné ce rôle des leucocytes, il serait intéressant de déterminer quelle est son importance chez les animaux immunisés et non immunisés. Nous espérons continuer les expériences commencées dans cette direction, car elles peuvent nous expliquer pourquoi les membranes des

diphtériques, solidement fixées à la muqueuse infectée, se détachent parfois avec une surprenante rapidité.

En terminant l'exposé de ces recherches cliniques et expérimentales, nous croyons devoir noter les principaux résultats suivants :

1^o La leucocytose du sang dans la diphtérie a un caractère particulier qui la distingue de la leucocytose observée dans la plupart des autres maladies infectieuses ;

2^o La leucocytose progressive dans la diphtérie donne un mauvais pronostic, et l'analyse du sang peut fournir des indications utiles sur la valeur du traitement ;

3^o Les bacilles diphtériques dans l'organisme même sont détruits par l'activité phagocytaire des leucocytes ;

4^o Les bacilles diphtériques des infections superficielles, par exemple, des muqueuses, sont enlevés de l'organisme infecté d'une façon mécanique, et il n'y a qu'une petite partie des bacilles qui subisse la destruction phagocytaire après décollement de la fausse membrane ;

5^o La propriété nécrotisante du virus diphtérique, qui s'étend à toutes les cellules de l'organisme, entrave l'activité phagocytaire ;

6^o Le sérum thérapeutique rend les cellules de l'organisme moins sensibles à l'action nécrotisante du virus diphtérique.

Le présent travail m'a été proposé par M. E. *Metchnikoff*, et je suis très heureux de pouvoir témoigner ma profonde gratitude à mon vénéré et cher maître pour le précieux concours qu'il a bien voulu me prêter pendant mes recherches.

APPENDICE

A. Observations cliniques sur la marche de la leucocytose chez les malades diphtériques.

Les cas d'observation cités n'ont pas été l'objet d'un choix spécial, et comme le diagnostic bactériologique ne pouvait être connu que dans les 24 heures, on a eu à constater sur 14 malades un cas de croup d'origine non diphtérique. Sur ces 14 malades, 10 ont été soignés au sérum thérapeutique à l'hôpital des Enfants-Malades, les 4 autres malades, à l'hôpital Trousseau, n'ont été soumis à aucun traitement spécifique.

Le nombre des globules rouges (E) et blancs (L) du sang a été déterminé par le compteur Thoma-Zeiss, la quantité d'hémoglobine (H) par l'appareil Gowers.

I. J. D. 5 ans. — *Diphtérie du pharynx et du larynx.*

1/vi. E = 4,510,000. 20 c. c. de sérum.

L = 15,850.

H = 75 0/0.

2/vi. E = 4,530,000. 10 c. c. de sérum.

L = 8,000.

H = 80 0/0.

3/vi. E = 5,350,000.

L = 11,000.

H = 84 0/0.

4/vi. E = 5,020,000. 10 c. c. de sérum.

L = 11,300.

H = 84 0/0.

5/vi. L = 9,200.

II. G. L. 5 ans 1/2. — *Diphtérie du pharynx.*

1/vi. E = 3,600,000. 20 c. c. de sérum.

L = 22,700.

H = 75 0/0.

2/vi. E = 3,975,000. 20 c. c. de sérum.

L = 12,200.

H = 60 0/0.

3/vi. E = 4,275,000.

L = 11,900.

H = 72 0/0.

4/vi. E = 4,150,000. 20 c. c. de sérum.

L = 9,370.

H = 72 0/0.

5/vi. L = 10,000.

III. A. R. 4 ans. — Diphthérie du pharynx.

4/vi. E = 4,750,000. 20 c. c. de sérum.

L = 11,450.

H = 84 0/0.

5/vi. E = 5,100,000. 20 c. c. de sérum.

L = 10,400.

H = 82 0/0.

6/vi. E = 4,770,000.

L = 12,000.

H = 80 0/0.

IV. M. J. 5 ans. — Diphthérie du pharynx.

Trachéotomie le 6/vi.

7/vi. 6 h. s. E = 4,000,000. 20 c. c. de sérum.

L = 25,000.

H = 90 0/0.

8/vi. 10 h. m. E = 4,025,000. Complication de scarlatine.

L = 20,220.

H = 90 0/0.

V. H. E. 3 ans. — Diphthérie du larynx.

Trachéotomie dans la nuit du 6 au 7/vi.

7/vi. 6 h. s. E = 4,350,000. 20 c. c. de sérum.

L = 15,000.

H = 80 0/0.

8/vi. 10 h. m. E = 4,800,000.

L = 13,750.

H = 85 0/0.

VI. A. V. — Diphthérie du pharynx.

9/vi. 6 h. s. E = 4,210,000. 20 c. c. de sérum à 6 h. 30 s.

L = 20,800.

10/vi. 10 h. m. E = 4,470,000. 10 c. cm. de sérum à 4 h. 30 m.

L = 16,600.

6 h. 30 m. E = 4,950,000.

L = 10,600.

VII. E. F. 7 ans. — Diphthérie du pharynx.

9/vi. 20 c. c. de sérum.

10/vi. 11 h. m. E = 5,070,000. 20 c. c. de sérum à 4 h. 30 m.

L = 24,000.

H = 95 0/0.

6 h. s. L = 20,800.

VIII. C. 2 1/2 ans. — Diphthérie du pharynx.

10/vi. 10 h. m. E = 4,320,000. 20 c. c. de sérum à 4 h. 30 m.

L = 29,500.

H = 78 0/0.

6 h. s. E = 4,373,000.

L = 31,300.

H = 80 0/0.

12/vi. Mort.

IX. I. S. 2 ans. — *Croup dans le larynx sans bacilles de Klebs-Löffler.*

16/vi. 9 h. 30 m. E = 4,520,000. 20 c. c. de sérum à 11 h. 45 m.

L = 12,500.

5 h. 15 s. E = 5,500,000. Le malade est à l'état d'asphyxie. Immédiatement après l'examen du sang on a fait la trachéotomie. Guérison.

X. L. B. 7 ans. — *Diphthérie du pharynx.*

15/vi. 20 c. c. de sérum.

16/vi. 10 h. m. E = 5,400,000. 10 c. c. de sérum à 11 h. 45 m.

L = 22,000.

H = 93 0/0.

5 h. 15 m. s. E = 5,000,000.

L = 15,000.

H = 90 0/0.

XI. E. B. 6 ans. — *Diphthérie du pharynx.*

4^{me} jour de maladie; les ganglions cervicaux très gonflés. T° 37,7 — 38,0. Guérison.

22/vi. L = 16,600.

23/vi. L = 14,800.

24/vi. L = 10,600.

XII. M. C. 9 ans. — *Diphthérie du pharynx.*

Les ganglions cervicaux sont gonflés; 3^{me} jour de maladie; t° 37,9 — 38,0. Guérison.

22/vi. L = 20,000.

23/vi. L = 12,500.

24/vi. L = 12,000.

25/vi. L = 9,400.

XIII. J. C. 4 ans. — *Diphthérie du pharynx.*

Les ganglions cervicaux sont gonflés; t° 37,5 — 38,0. Mort.

22/vi. L = 38,000.

23/vi. L = 13,000.

24/vi. L = 42,700.

25/vi. Mort.

XIV. M. D., 8 ans. — *Diphthérie du pharynx et de la cavité buccale.*

8^{me} jour de maladie; t° 38,6 — 40,0. Mort.

23/vi. L = 40,000.

24/vi. L = 34,100. On a fait la trachéotomie le soir.

26/vi. Mort.

B. — *Observations sur la leucocytose des lapins diphtériques. Expériences sur le traitement curatif et préventif de la diphtérie.*

I. 23/vii. A trois lapins, pesant 1,870, 1,820 et 1,950 grammes, on a fait à 8 h. 30 du matin une injection sous-cutanée, à chacun, de 5 c. c. de culture diphtérique dans du bouillon, et à 11 h. 30 m., on a injecté, en outre, aux deux premiers lapins, 0,5 de sérum; le 3^{me} était comme témoin. Nous citons les résultats de l'analyse quotidienne du nombre des leucocytes du sang (L), et de la température (T), dans la table suivante:

Temps.	1 ^{er} lapin.		2 ^e lapin.		Lapin témoin.	
	L.	T.	L.	T.	L.	T.
22/vii 4 h. s.	11,000	39,3	11,800	39,4	9,100	38,9
23/vii 8 h. 30 m. m.	Injection de 0,5 c. c. de culture de bac. diphtér.					
11 h. 30 m. m.	8,300	39,7	7,300	39,6	12,500	39,5
	injection de 0,5 c. c. de sérum.					
5 h. s.	12,000	40,2	8,300	40,0	14,000	40,3
24/vii 8 h. 30 m. m.	11,800	39,3	9,400	39,7	12,500	39,3
5 h. s.	13,500	39,8	11,500	39,0	23,700	39,3
25/vii 8 h. 30 m. m.	12,600	39,7	11,400	39,6	30,000	37,8
5 h. s.	17,900	39,8	15,000	39,5	36,600	36,0
26/vii 8 h. m.	17,700	39,2	13,500	39,6	Mort	
5 h. s.	14,800	39,7	8,500	39,8		
27/vii 8 h. m.	17,700	39,2	10,800	39,5		
28/vii 8 h. m.	17,800		9,600			
29/vii 8 h. m.	15,200		10,000			
30/vii 8 h. 30 m.	11,100		9,700			

Remarque. L'augmentation du nombre des leucocytes, depuis le 25/vii. chez les deux premiers lapins, s'explique par l'inflammation à l'endroit de l'injection de la culture et ensuite du sérum. Une partie de la peau est nécrosée.

II Dans l'expérience suivante, le sérum thérapeutique est injecté 7 heures après l'infection. Injections répétées du sérum. Poids des lapins: 1,875, 1,885, 1,745 et 1,800 grammes.

Temps.	1 ^{er} lapin.		2 ^e lapin.		3 ^e lapin.		Lapin témoin.	
	L.	T.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
25/vi 4 h. 30 m. s.	5,000	38,6	7,500	39,0	10,000	38,9	9,000	38,8
26/vi 8 h. 30 m. m.	injection de la culture diphtér., 0,5 c. c., aux lapins.							
3 h. 30 m. s.	14,000	38,8	12,000	39,2	13,100	39,1	10,000	38,8
	Injection de 0,5 c. c. de sérum.							
8 h. 30 m. s.	14,000	38,8	19,000	39,3	18,700	39,2	16,200	38,8
27/vi 8 h. 30 m. m.	17,000	38,3	14,100	38,5	18,000	38,2	18,700	38,4
8 h. 30 m. s.	10,000	38,4	9,100	38,8	12,000	38,2	19,100	40,1
28/vi 8 h. 30 m. m.	14,500	38,6	10,000	39,0	16,200	38,2	26,600	39,5
29/vi 8 h. 30 m. m.	19,500	38,0	12,000	39,2	35,200	37,0	20,000	39,3
	inject. de 0,5 c. c. de sérum. Morts en 2-3 heures.							
30/vi 8 h. m.	22,900	37,8	11,400	39,4				
1/vii 8 h. 30 m. m.	22,500	36,0	8,200	39,5				
	Mort							

ANALYSE MICROSCOPIQUE DES COUPES DES YEUX ÉNUCLÉÉS

Au bout d'une heure.

Lapin non immunisé. — Sur la surface antérieure de l'iris on aperçoit par-ci par-là des bacilles à l'état libre. Commencement de l'exsudation fibrineuse et émigration des leucocytes du sang; pas de leucocytes dans la chambre antérieure de l'œil.

Lapin immunisé. — On trouve des bacilles libres à la surface de l'iris; exsudation fibrineuse; on remarque dans quelques endroits, près des grumeaux de bacilles, de petits amas de leucocytes.

Au bout de trois heures.

Lapin non immunisé. — L'exsudation purulente couvre presque toute la surface de l'iris tournée vers la chambre antérieure. Les vaisseaux de l'iris sont hyperémiés. Émigration des leucocytes. Les phagocytes sont disséminés le long de la couche de l'exsudation, mais on observe encore beaucoup de bacilles libres.

Lapin immunisé. — Le caractère général du tableau est le même que dans le cas précédent, mais il y a moins de bacilles libres.

Au bout de huit heures.

Lapin non immunisé. — La phagocytose atteint le maximum de son développement, mais en même temps le nombre des bacilles diphtériques augmente aussi; plusieurs leucocytes ou phagocytes sont nécrosés.

Lapin immunisé. — La phagocytose atteint le dernier stade de son développement. Dans un grand nombre de cellules on n'observe que des restes de bacilles modifiés dans leur forme et dans leur coloration. Point de bacilles libres. La désagrégation des leucocytes est plus faible que celle du lapin non immunisé. Le tissu de l'iris est fortement infiltré de globules de pus.

Au bout de vingt-quatre heures.

Lapin non immunisé. — Nécrose de presque tous les leucocytes et commencement de la nécrose de l'iris qui est infiltré de leucocytes à un faible degré. On observe une masse de bacilles diphtériques sur la surface antérieure et postérieure de l'iris. Sur cette dernière, on rencontre beaucoup de phagocytes normaux.

Lapin immunisé. — Nécrose complète de la chambre antérieure de l'œil, avec l'iris et avec tous les éléments cellulaires. L'œil n'a pas été énucléé, parce que toute la partie antérieure de l'œil a été séquestrée. Les bacilles libres s'observent au milieu des foyers purulents contenant les leucocytes désagrégés en une masse granuleuse.

II. Cette expérience a dû être faite sur six lapins, mais l'un d'eux est mort d'une cause inconnue, de sorte que la leucocytose générale et les phénomènes anatomo-pathologiques de l'œil n'ont pu être observés que sur quatre lapins, 3 et 24 heures après l'injection des yeux. Les lapins pesaient: 1,710, 4,750, 1,600 et 1,450 grammes.

Temps.	LAPINS NON IMMUNISÉS				LAPINS IMMUNISÉS			
	1		2		3		4	
	L.	T.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
9/vii 10 h. m. m.	12,000	39,5	12,000	39,6	11,200	39,2	10,800	39,0
11 h. m. m.	inject. de 0,5 c. c. de sérum							
10/vii 8 h. 30 m. m.	Injection de la culture de bacille diphtérique dans la chambre antérieure des yeux.							
11 h. 30 m.	12,500	39,0			17,000	39,2		
11/vii 8 h. 30 m. m.			19,800	36,0			8,500	39,1
	mort 14/vii		mort à 1 h. 11/vii					

ANALYSE MICROSCOPIQUE DES COUPES DES YEUX ÉNUCLÉÉS

Au bout de trois heures.

Lapin non immunisé. — L'exsudation purulente s'est formée sur la surface de l'iris; infiltration leucocytaire du tissu même de l'iris. Phagocytose; mais la plus grande partie des bacilles diphtériques est libre.

Lapin immunisé. — L'infiltration leucocytaire de l'iris et l'agglomération des leucocytes dans la chambre antérieure sont plus accusées que chez le lapin non immunisé. La phagocytose est considérable, bien que l'on observe encore des bacilles libres.

Au bout de vingt-quatre heures.

Lapin non immunisé. — Les leucocytes, dans la chambre antérieure de l'œil, sont détruits; on n'y aperçoit pas de bacilles. Des foyers de phagocytes sur la surface postérieure de l'iris, dont quelques-uns commencent à se nécroser; on trouve peu de bacilles libres. La partie antérieure de l'œil s'est détachée sans opération à cause de la nécrose.

Lapin immunisé. — La chambre antérieure offre la même nécrose complète des leucocytes. L'iris est fortement infiltré de leucocytes, mais il n'est pas nécrosé. Point de bacilles diphtériques dans l'œil.

III. L'expérience suivante avait été faite sur six lapins, dont trois ont été immunisés avec 5 c. c. de sérum, trois jours d'avance. Le poids des lapins non immunisés est de: 1,700, 1,680 et 1,715 grammes; celui des lapins immunisés, de 1,570, 1,700 et 1,680 grammes.

Temps.	LAPINS NON IMMUNISÉS					
	1		2		3	
	L.	T.	L.	T.	L.	T.
17/vii 9 h. m.	12,500	39,1	10,000	39,5	9,000	39,3
18/vii 8 h. 30 m. m.	Injection de la culture de bacille diphtérique dans la chambre antérieure des yeux.					
11 h. 30 m.	12,500	39,0				
5 h. s.			16,000	39,6		
19/vii 8 h. 30 m. m.					16,600	38,8
	mort 21/vii		mort 20/vii		mort 20/vii	

		LAPINS IMMUNISÉS					
		1		2		3	
Temps.		L.	T.	L.	T.	L.	T.
17/vii	8 h. 30 m. m.	12,500	39,4	10,800	38,8	7,000	39,5
18/vii	8 h. 45 m. m.	Injection de la culture de bacille diphtérique dans la chambre antérieure des yeux.					
	11 h. 45 m. m.	13,800	39,1				
	4 h. 30 m.			23,000	39,1		
19/vii	8 h. 30 m.					9,100	39,0

ANALYSE MICROSCOPIQUE DES COUPES DES YEUX ÉNUCLÉÉS

Au bout de trois heures.

Lapin non immunisé. — La réaction leucocytaire est considérable, la phagocytose l'est aussi, mais on observe une grande quantité de bacilles libres.

Lapin immunisé. — On voit plus de leucocytes que chez le lapin non immunisé, et tous les bacilles sont contenus dans les phagocytes.

Au bout de huit heures.

Lapin non immunisé. — Malgré la phagocytose très considérable, il y a beaucoup de bacilles diphtériques libres. Les leucocytes et les phagocytes ont déjà, en partie, subi la nécrose.

Lapin immunisé. — Peu de bacilles diphtériques, ils sont tous contenus dans les phagocytes. La réaction leucocytaire de ce cas est généralement insignifiante.

Au bout de vingt-quatre heures.

Lapin non immunisé. — Destruction complète des leucocytes; peu de bacilles libres. La chambre antérieure est nécrosée; elle s'est détachée sans opération.

Lapin immunisé. — Peu de leucocytes nécrosés, tout l'iris est infiltré de leucocytes. Point de bacilles diphtériques.

D. — Expériences qui démontrent que les bacilles diphtériques contenus dans les phagocytes sont vivants et virulents, et que les humeurs des lapins immunisés n'ont pas de propriétés bactéricides.

I. 17/vii. 9 h. m. Une injection sous-cutanée de 5 c. c. de sérum a été faite à un lapin; le 18/vii, à 8 h. 30 m. du matin, on a injecté, dans la chambre antérieure de l'œil, une épaisse émulsion de bac. diphtérique, comme on l'avait fait dans les expériences de la précédente série. A 8 h. 30 m. du soir, on a retiré de la chambre antérieure de l'œil infecté toute l'humeur aqueuse, dont on a injecté 4 c. c. à un cobaye pesant 320 grammes.

Les expériences précédentes ayant démontré que, chez les lapins immunisés, tous les bacilles sont contenus dans les phagocytes au bout de 8 heures, on pouvait s'attendre, à plus forte raison, qu'il n'y a pas de bacilles libres dans l'œil 12 heures après l'infection. Le cobaye est mort 4 jours après.

Avec la même humeur de l'œil, on a préparé une culture dans du bouillon. Deux jours après, on en a obtenu une culture pure de bacilles diphtériques qui, après avoir été injectée, le 20/vii, en quantité de 1 c. c. à un cobaye, pesant 300 grammes, l'a tué en 48 heures. Cette expérience a été répétée, elle a donné le même résultat.

II. 30/vii. Deux lapins ont été immunisés chacun par 1 c. c. de sérum.

31/vii. A ces deux lapins immunisés, et à deux lapins témoins on a retiré, au moyen de tubes stérilisés, l'humeur aqueuse des yeux, et ces quatre tubes ont été ensemencés avec une petite quantité de culture du bacille diphtérique.

1/viii. On a obtenu, dans les 4 tubes, une culture pure de bacilles diphtériques. Deux de ces cultures, une d'un lapin immunisé, et l'autre d'un lapin non immunisé, ont été injectées en quantité de 0,2 c. c. à deux cobayes de 410 et 480 grammes.

3/viii. Le cobaye (de 480 grammes) est mort à la suite de l'injection de la culture provenant d'un lapin immunisé.

4/vi. L'autre cobaye (de 410 grammes) est aussi mort. Par conséquent, la virulence des bacilles diphtériques s'est accrue dans l'humeur de l'œil du lapin immunisé.

1/viii. Des 4 cultures de bacilles diphtériques obtenues, le 1/viii, dans l'humeur aqueuse des yeux des lapins, on a ensemencé du bouillon et de la gélose.

2/viii. La culture des bacilles diphtériques provenant des lapins immunisés est plus abondante que celle des lapins témoins. Des injections sous-cutanées de cultures provenant d'un lapin immunisé et de deux lapins non immunisés ont été faites à trois cobayes.

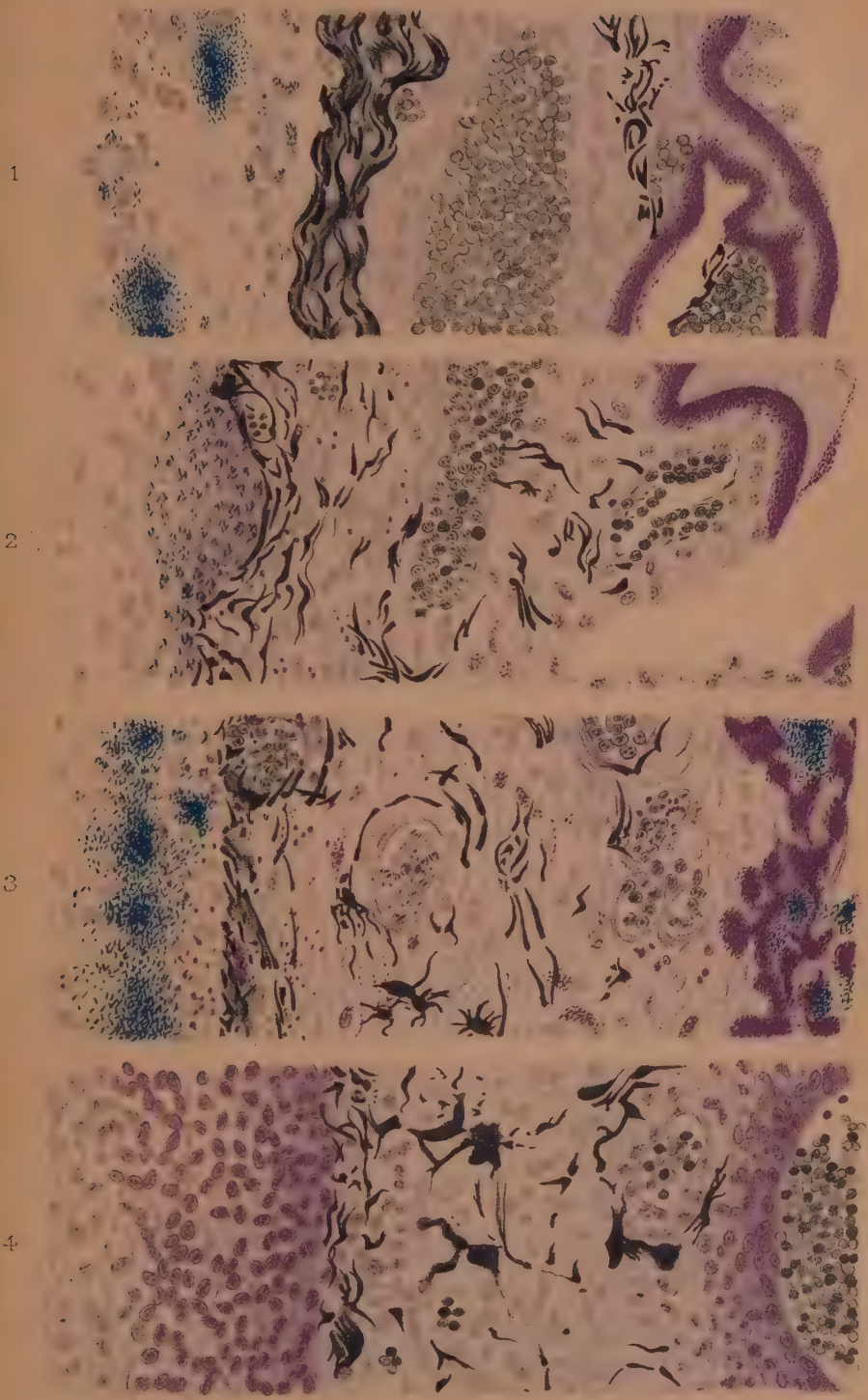
3/viii. Entre 10 et 11 heures du matin, sont morts les deux cobayes infectés avec des cultures provenant des lapins immunisés. Le troisième cobaye témoin est mort 5 heures après les deux premiers.

L'expérience a été répétée avec 4 autres lapins et elle a donné les mêmes résultats.

En outre, on a ensemencé le sérum du sang des lapins immunisés et non immunisés avec des bacilles diphtériques, et, au bout de 24 heures, on a obtenu une culture plus abondante sur le sérum des lapins immunisés.

LITTÉRATURE

1. VAILLARD ET VINCENT, Contribution à l'étude du tétanos. (*Annales de l'Institut Pasteur*, n° 1, 1894.)
2. CANTACUZÈNE (J.), *Recherches sur le mode de destruction du vibron cholérique dans l'organisme*. Paris, 1894.
3. KIRODZÉ, *L'anatomie pathologique du sang dans l'inflammation fibrineuse des poumons*. Thèse de doctorat, en russe. Saint-Petersbourg, 1890.
4. JAKSCH, *Centralblatt für klinische Medizin.*, n° 5, 1892.
5. RIEDER, *Münch. medic. Wochenschrift*, n° 511, 1892.
6. TCHISTOVITCH, Sur la quantité des leucocytes du sang dans les pneumo-



nies fibrineuses à issue mortelle. (*Arch. des sciences biologiques*, n° 5. J. II. 1893.)

7. LOEFFLER. *Mittheilungen aus dem Kaisert. Gesundheitsamte*. Bd. II, 5. 461.

8. RUFFER, A. Preliminary note on the processes taking place in the diphteritic membrane. (*British med. Journal*, July 26, p. 202, 1890.

9. MASSART (J.), Le chimiotaxisme des leucocytes et l'immunité. (*Annales de l'Institut Pasteur*, p. 326, 1892.)

10. BARDACH, *Recherches sur la diphtérie*, thèse russe, Moscou, 1894.

11. KUTSCHER, Der Nachweis der Diphteriebacillen in den Lungen mehrerer an Diphterie verstorbenen Kinder, *Zeitschrift für Hygiene und Infections-Krankheiten*. Bd. XVIII, H. I, 1894.

12. MOREL (CHARLES), *Contribution à l'étude de la diphtérie*. Paris, 1891.

13. OERTEL, Ueber das diphteritische Gift und seine Wirkungsweise. (*Deutsch. medic. Woch.* N° 45, 1890.)

14. CHATENEY (G.), *Les réactions leucocytaires vis-à-vis de certaines toxines végétales et animales*. Paris, 1894.

15. SAMOILOFF, 1. Beiträge zur Kenntniss des Verhaltens des Eisens in thierischen Organismus; 2. Ein Beitrag zur Pharmakologie des Silbers. (*Arbeiten des Pharmakologischen Institutes zu Dorpat*, IX, 1893.)

16. LIPSKI, Ueber die Ablagerung aus Ausscheidung des Eisens aus dem thierischen Organismus. (*Ibidem*.)

17. GABRITSCHESKY, Mikroskopische Untersuchungen ueber Glycogenreaction im Blut. (*Arch. für Experim. Pathologie und Pharmacologie*. T. XXVIII.)

18. LEBER. *Die Entstehung der Entzündung und die Wirkung der entzündungserregenden Schädlichkeiten*. Leipzig, 1891.

19. BERESTNEW, Des propriétés fermentatives du sang et du pus. (*Arch. des sciences biologiques*, n° 1, p. III, 1894.)

EXPLICATION DE LA PLANCHE XIII.

1. Coupe de la partie antérieure de l'œil du lapin non immunisé, 8 heures après l'infection (C. I.).

2. Coupe de la partie antérieure de l'œil du lapin immunisé (C. I.).

3. Coupe de la partie antérieure de l'œil du lapin non immunisé, 24 heures après l'infection (C. I.).

4. Coupe de la partie antérieure de l'œil du lapin immunisé (C. III).

Pour la description détaillée de ces coupes, voir l'Appendice (C. I-III).

ACTION DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

SUR UN POISSON MARIN, L'HIPPOCAMPE

PAR MM. SABRAZÈS ET COLOMBOT

Pendant le cours des années 1893 et 1894, nous avons pu, grâce à la bienveillante hospitalité que nous a accordée à la Station zoologique d'Arcachon M. le professeur Jolyet, expérimenter sur les animaux marins l'action de la bactéridie charbonneuse.

Les recherches de cet ordre exigent de grandes précautions. Nous nous sommes d'abord efforcés de placer nos animaux dans d'excellentes conditions de vie. Ils étaient isolés dans de vastes aquariums où l'eau de mer se renouvelait sans cesse, et qui constituaient un habitat compatible avec des observations très prolongées.

Pour éviter les infections secondaires, qui auraient pu fausser nos résultats, nous avons vérifié, par l'examen direct et par la culture, la stérilité du sang et des divers organes de l'hippocampe, choisi, de propos délibéré, comme sujet d'étude¹. L'épiderme et le revêtement intestinal de ce poisson osseux ont une épaisseur relativement considérable, et paraissent s'opposer normalement à la pénétration des bactéries².

Il n'existe dans le sang de ce lophobranch qu'un très petit nombre de globules blancs, représentés par des lymphocytes et par des leucocytes mononucléaires; on n'observe pas de leucocytes polynucléaires. Nous avons vainement cherché la rate avec l'aide de M. Phisalix.

A première vue, il semblait donc en être de l'hippocampe comme de certains crustacés, chez lesquels « la faiblesse de

1. Le genre *Hippocampe* comprend deux espèces déterminées par Cuvier; elles ne diffèrent que par des détails de morphologie extérieure peu importants. Nous avons indistinctement opéré sur ces deux espèces, qui se rencontrent à Arcachon.

2. L'hippocampe n'est cependant pas absolument dépourvu de parasites : à la surface du foie et des reins il n'est pas rare de rencontrer des kystes, qui sont de nature psorospermique.

la protection phagocytaire se trouve très probablement en relation avec l'épaisseur des parois cuticulaires qui revêtent non seulement toute la surface extérieure, mais aussi l'intestin¹ ».

L'hippocampe est, de plus, un animal très vivace, capable de s'accommoder de conditions extérieures précaires. Il peut séjourner, pendant plusieurs jours, dans des récipients étroits et mal aérés, supporter pendant une semaine des températures de 30° à 32°. Il devenait intéressant de rechercher quels sont les moyens de défense qu'il met en œuvre pour résister aux virus.

Nous étions d'autant plus enclins à opérer sur l'hippocampe que ce poisson constitue, vis-à-vis des infections, un réactif des plus sensibles. Grâce au jeu de ses chromatophores, il traduit en effet son état morbide par des phénomènes de dépigmentation très visibles, passagers ou permanents, suivant que l'action exercée sur lui, par les agents étrangers, est plus ou moins nocive.

La bactéridie charbonneuse a été choisie de préférence aux autres microbes, parce qu'elle est facile à reconnaître, à cultiver, et qu'elle convient admirablement pour l'appréciation des degrés de virulence.

Nous avons adopté, comme porte d'entrée, le tissu cellulaire de la queue et la cavité générale, plutôt que les voies digestives, qui sont difficilement accessibles.

L'infection directe des aquariums ne nous a pas semblé devoir être réalisée, en raison du pouvoir bactéricide de l'eau de mer.

Les plus grandes précautions d'asepsie étaient régulièrement prises. Nous opérons par piqure à l'aide d'une seringue à piston d'amiante stérilisée par la chaleur. Toutes les fois que nous pratiquons une inoculation, nous injectons à des témoins, dans les mêmes régions, des quantités égales d'eau stérilisée ou de bouillon de bœuf peptonisé, pur de tout germe. Un demi-centimètre cube des cultures, en bouillon, datant de deux jours, que nous avons utilisées, tuait un lapin du poids d'un kilogramme en 34 heures.

1. *Elie Metchnikoff*, Leçons sur la pathologie comparée de l'Inflammation, 1892, p. 403.

Il fallait se préoccuper tout d'abord d'établir quelle était l'influence des bouillons stériles, des différentes doses du virus utilisé, de la température sur la résistance de l'hippocampe.

L'inoculation sous la peau d'un centimètre cube de bouillon de bœuf peptonisé n'ayant pas encore servi à la culture est inoffensive. Les bouillons charbonneux, débarrassés de tout germe par filtration à la bougie Chamberland, sont mortels, dans un délai de 24 heures, à la dose d'un centimètre cube.

Ces constatations préliminaires témoignent donc de la nocuité des virus plutôt que des véhicules employés.

Si nous envisageons maintenant, sans entrer dans le détail minutieux de chacune des expériences, l'ensemble de nos inoculations successives, nous voyons s'affirmer ce fait intéressant d'une bactérie, virulente au premier chef pour un certain nombre d'animaux à sang chaud, qui exerce ses propriétés pathogènes sur un poisson de mer, sans qu'on soit obligé d'élever artificiellement la température du milieu ambiant. Pendant la durée de nos recherches, le thermomètre a oscillé entre 26° et 14° cent.

L'organisme des hippocampes, qui ont succombé à l'inoculation le 12 et le 15 septembre, est infiltré de bactériidies au même titre qu'une souris ou qu'un lapin charbonneux.

La maladie évolue en huit jours lorsque la quantité de bouillon inoculé ne dépasse pas un quart de c. c. l'injection étant faite dans le tissu cellulaire sous-cutané, en six jours quand la même quantité est introduite dans la cavité générale. La porte d'entrée du virus influe donc sur la marche de l'infection.

La quantité et la qualité des germes inoculés ont aussi leur importance.

Des spores, insérées à dose massive sous la peau de l'hippocampe, se développent sans retard et sont le point de départ d'une infection mortelle à brève échéance.

En faisant pénétrer dans les tissus un demi-centimètre cube de bouillon virulent, on provoque, si on élève artificiellement à 28° la température du milieu, une mort quasi foudroyante par intoxication.

Tel est le résultat brut de nos expériences; il soulève des problèmes d'une interprétation délicate, relatifs aux réactions réciproques de l'organisme de l'hippocampe d'une part, de la bactériodie charbonneuse d'autre part.

Si on sacrifie les animaux à intervalles réguliers, on voit clairement que les microbes déposés dans le tissu cellulaire émigrent bientôt dans les divers organes. 30 heures après l'inoculation, on en trouve dans le foie, les branchies, les reins ; le sang du cœur présente des phagocytoses. Au bout de 60 heures, on ne retrouve guère des bactéridies qu'au point d'inoculation ; leur nombre est relativement peu élevé par rapport à la dose injectée ; il existe une infiltration leucocytaire manifeste.

Les bactéridies libres sont *tout à fait normales*. Leur nombre diminuant d'une façon progressive, il semblerait *a priori* qu'elles dussent finir par disparaître, après s'être comportées comme des hôtes absolument inoffensifs pour les animaux en expérience.

Mais qu'on les reprenne par la culture : on s'aperçoit que leur passage dans les humeurs de l'hippocampe, loin de les avoir atténuées, les a renforcées, puisqu'un lapin du poids de 1,150 grammes succombe, toutes choses égales, trente heures après leur inoculation.

Ce virus, partiellement détruit, est donc encore représenté par des bactéridies depositaires de sa virulence, capables de se multiplier, d'engendrer ultérieurement des générations nouvelles que des sélections successives rendent plus vivaces. Bien plus, l'expérience prolongée démontre que ces bactéridies, au lieu de disparaître, s'accroissent et se segmentent avec une telle intensité qu'elles envahissent finalement tout le territoire vasculaire de l'hippocampe. Les coupes des divers organes sont très démonstratives à cet égard.

Quels sont les moyens mis en œuvre par l'animal pour lutter avec avantage contre les premières atteintes de l'infection ?

Dès le début, une heure après l'injection, il est facile de voir des phénomènes de phagocytose dans la région inoculée ; au bout de deux heures, leur nombre a considérablement augmenté ; les bactéries incluses sont légèrement tuméfiées et ne se colorent pas uniformément. A la fin du premier jour, la présence dans le sang de leucocytes qui charrient des bactéridies, et constituent pour elles des agents actifs de dissémination, plaide en faveur d'une lutte d'ordre cellulaire ; sous la peau on surprend aussi des phagocytoses remarquables.

Les humeurs de l'hippocampe ne nous ont pas paru être défavorables *in vivo* au développement du *bacillus anthracis*, puis-

que des spores inoculées le 18 septembre ont produit, dans un bref délai, des filaments. L'aspect normal de la majorité des éléments bactériens qui infiltrent les branchies, le foie, les reins, etc., au sixième et au neuvième jour, vient à l'appui de cette assertion.

In vitro, les bactéries ensemencées dans le sang du cœur et placées sur la platine d'un microscope recouvert d'une cloche opaque s'accroissent et se divisent ; les solutions de vésuvine ne les colorent pas en brun foncé. A la vingtième heure, les bactéries libres mélangées au sang du cœur de l'hippocampe n'ont subi aucune altération appréciable ; transportées dans du bouillon, elles prolifèrent abondamment.

On constate un renforcement de la virulence, non seulement après un séjour de 24 à 48 heures du *bacillus anthracis* dans les tissus de l'hippocampe, mais encore au bout d'une semaine, alors que les foyers de multiplication du microbe inoculé encombrant tous les vaisseaux. Nous admettrions la réalité d'un processus de destruction sur place des bacilles charbonneux, sans l'intervention des phagocytes, si l'on trouvait, en dehors des cellules, tous les microbes en voie de dégénérescence.

On pourrait essayer alors, d'après cette hypothèse, d'interpréter par la survie de quelques germes particulièrement résistants, acclimatés à la longue au terrain qui leur était primitivement défavorable, la dissémination et la multiplication ultime du parasite dans les organes.

Un examen minutieux enlève tout crédit à cette interprétation.

Dans les préparations fournies à intervalles plus ou moins espacés, et à partir du début de l'infection, par la sérosité des régions inoculées, un bon nombre de bactéries libres contrastent par la régularité de leurs contours, la longueur de leurs segments, leur avidité pour les couleurs d'aniline, l'homogénéité de leur coloration, avec les bactéries englobées qui sont à des stades divers de digestion intracellulaire. Sur les coupes du foie, des branchies, des reins, des parois intestinales, etc., ce contraste apparaît plus éclatant encore.

Quelques faits sembleraient, de prime abord, militer en faveur d'une influence modificatrice prépondérante exercée par les humeurs sur la bactérie charbonneuse, si on se contentait d'une observation superficielle et incomplète. Dans le sang du cœur de

l'hippocampe inoculé le 6 septembre, et mort spontanément le 13, on rencontre des éléments polyarticulaires, disposés en streptobacilles, voire en streptococci; ils sont mal colorés, inégalement tuméfiés. Leur longueur extrême, qui peut dépasser 50 μ , cadre assez mal, semble-t-il, avec l'hypothèse d'un englobement phagocytaire récent. Ces formes involutives seraient-elles dues à l'action néfaste du plasma sanguin?

La réponse n'est pas aisée. Considérons cependant qu'il existe des éléments tout à fait normaux, en dehors des cellules, à côté des chaînes de bactéridies frappées de déchéance, qu'on trouve en outre des détritits cellulaires plus ou moins cohérents en même temps que des leucocytes volumineux, en voie de désintégration, contenant dans leur intérieur des *chapelets de segments microbiens manifestement altérés*. Parmi ces phagocytes, il en est qui, succombant dans la lutte, s'accumulent dans le sang et s'y débarrassent de leurs parasites. Ceux-ci, profondément modifiés dans leurs propriétés morphologiques, sont encore capables de se multiplier et de donner naissance aux formes bactériennes sus-décrites. A cette période terminale de l'infection, des amas fasciculés de bactéridies normales occupent, dans le foie, les vaisseaux intertrabéculaires et le système porte circonscrit par des bourgeons pancréatiques; dans les reins, les espaces intertubulaires dans les branchies, tout le réseau vasculaire qui est remarquablement injecté. Ces préparations se différencient de celles que l'on obtient avec le sang du cœur où sont, pour ainsi dire, collectés, après la mort, les déchets de la phagocytose.

L'étude de la sérosité péritonéale de l'hippocampe inoculé le 6, mort le 12, soulève des problèmes du même ordre; là encore se pose la question de savoir si les formes d'involution que l'on observe immédiatement après la mort sont dues à l'influence directe de l'exsudat séreux, ou sont la conséquence d'un acte cellulaire. Les bactéridies libres sont, pour la plupart, à divers stades de dégénérescence; quelques-unes ont exceptionnellement une longueur de 50 à 60 μ . Leur *groupement en amas arrondis ou ovulaires*, leur *tassement* incite à supposer qu'elles ont eu primitivement un substratum cellulaire commun. On est d'autant plus enclin à ne pas abandonner cette explication, qu'on retrouve toutes les phases intermédiaires entre ces aggloméra-

tions microbiennes et des phagocytoses multiples d'où elles dérivent. Ces phagocytes sont des éléments cellulaires dont le noyau est tantôt très apparent, tantôt invisible, et dont le protoplasme plus ou moins vacuolaire englobe de nombreux tronçons bactériens juxtaposés ou entrecroisés. Même en ces points où la vitalité du virus semblerait compromise, si l'on se bornait à un examen superficiel, on voit des bacilles charbonneux d'aspect normal, et l'ensemencement démontre que, sur les milieux usuels, le microbe colonise activement.

La dissémination précoce des bactériidies, l'existence d'une hyperleucocytose à la période d'état de l'infection et d'un parallélisme entre l'abondance des phénomènes phagocytaires et le nombre des formes bactériennes involutives, la constatation de tous les termes de passage entre les foyers parasitaires groupés étroitement en corps arrondis et l'inclusion de foyers analogues dans l'intimité de cellules susceptibles de succomber à leur tour et de permettre aux parasites inclus de se libérer, constituent de sérieux arguments en faveur du rôle que joue la phagocytose dans l'infection expérimentale de l'hippocampe par le *bacillus anthracis*.

Par contre, les cultures positives *in vitro* dans le sang du cœur, l'intégrité de la bactériodie mise au contact du sérum, la présence, au point d'inoculation, siège d'un empâtement œdémateux, dans le sang et surtout dans les viscères, de segments bactériadiens normaux, longs de 3 à 5 μ , coupés court aux extrémités, bien calibrés, se colorant uniformément et d'une façon intense, enfin la multiplication ultime, dans tous les organes, de bactériidies normales d'une virulence extrême, nous mettent dans l'obligation de considérer comme douteuses les propriétés bactéricides des humeurs chez l'hippocampe.

Le phagocytisme a pour acteurs des leucocytes dont les diamètres mesurent, à l'état physiologique, 12 μ sur 10 μ . Leur noyau (6 μ sur 3 μ), est unique, ovulaire, compact, d'aspect granuleux; il se colore vivement par le bleu de méthylène, tandis que le protoplasme reste incolore ou ne prend qu'une légère teinte bleutée. Ces éléments se retrouvent partout où l'on relève des phénomènes de phagocytose. On les reconnaît généralement à travers leurs modifications morphologiques : ils peuvent en effet se vacuoliser, s'hypertrophier, s'effiler, perdre leur noyau, se désagréger.

Dans le foie, les cellules endothéliales collaborent puissamment à la phagocytose, se transforment en cellules étoilées de Kupffer et en macrophages de grandes dimensions qui emprisonnent des globules rouges, du pigment hématique, des leucocytes, des bactéries dégénérées à segments courts, inégaux, de teinte variable, agglomérés sans ordre.

La mise en jeu de ces moyens de défense coïncide avec une dilatation très accusée des vaisseaux, et s'exerce à la température ambiante de 14° à 26°, à la température artificielle de 28°.

Immédiatement après l'inoculation, les téguments de l'hippocampe subissent une dépigmentation progressive. En examinant la peau par délamination ou sur des coupes histologiques, on voit que ce phénomène est dû à la rétraction des chromatophores qui se condensent isolément en boules plus ou moins espacées, au lieu de former, comme à l'état normal, un enchevêtrement compact, une bordure continue d'un noir intense.

Dans les viscères, on note de la dégénérescence vacuolaire des cellules hépatiques et de la tuméfaction trouble des épithéliums rénaux.

L'englobement des bactéridies s'observe surtout au point d'inoculation, pendant toute la durée de la maladie. On en voit des exemples dans les vaisseaux du foie et aussi dans le sang du cœur; ils sont plus rares dans les reins et dans les branchies.

Tels sont les faits principaux afférents au mode de réaction de l'hippocampe vis-à-vis du charbon.

Quant au parasite, nous avons indiqué les modifications morphologiques qui peuvent lui être imprimées; ces modifications sont éphémères; elles ne se reproduisent pas *in vitro*, où le microbe fait retour au type normal et, loin d'être atténué, a augmenté de virulence.

Nos bouillons charbonneux primitifs tuaient, 2 jours après l'ensemencement, un lapin du poids d'un kilogramme en 34 heures, à la dose d'un demi-centimètre cube injecté sous la peau.

Après passage dans l'organisme de l'hippocampe, la dose de la culture pure étant abaissée à un quart de c. c., un lapin du poids d'un kilogramme succombait en 26 heures; la semence provenait de l'hippocampe inoculé le 6 à la racine de la queue et mort spontanément le 13 septembre. A même dose, une culture

retirée d'un hippocampe chauffé tuait un lapin d'un kilogramme en 20 heures.

Un lapin pesant 1,150 grammes succombait en 30 heures à l'inoculation d'une culture prélevée sur gélose provenant de l'hippocampe inoculé le 6 à la racine de la queue, sacrifié le 7 septembre.

Des cultures, fournies par un hippocampe inoculé avec des spores charbonneuses, résultant les unes de l'ensemencement de la sérosité péritonéale, les autres du sang cardiaque, ont tué, les premières un lapin de 1,160 grammes en 24 heures et deux rats noirs de 75 et 80 grammes en 24 heures, les secondes deux rats noirs de 75 et 80 grammes en 20 heures et en 22 heures.

Ces expériences, toutes concordantes, montrent que la virulence de la bactériémie ne s'atténue pas, mais plutôt s'exagère après passage à travers l'organisme de l'hippocampe. A ce point de vue spécial, ce poisson marin se comporte donc comme un animal relativement réfractaire chez lequel l'infection expérimentale évolue lentement par suite d'une lutte énergique, qui relève essentiellement de la phagocytose entre l'organisme envahi et le parasite envahisseur.

La température de l'eau de mer, relativement basse, même pendant la saison estivale, contribue aussi, dans une certaine mesure, à ralentir la marche du processus infectieux et à retarder l'issue fatale. Mais ces moyens de défense deviennent impuissants et sont loin de suffire à immuniser l'animal.

Bientôt, l'agent microbien renforcé dans sa virulence se multiplie, envahit les organes, s'y développe en colonies compactes qui obstruent les vaisseaux. L'hippocampe ne tarde pas alors à succomber.

En élevant la dose des virus inoculés on provoque une intoxication suraiguë plutôt qu'une infection.

SOMMAIRE DES PRINCIPALES EXPÉRIENCES

— Deux hippocampes sont inoculés à la racine de la queue, le 6 septembre 1893, avec un quart de centimètre cube d'une culture datant de deux jours dans du bouillon peptonisé. L'un d'eux a été sacrifié le 7, l'autre le 8 septembre. La température de l'eau variait de 22° à 26° cent.

— A la même date, deux hippocampes sont inoculés avec la même culture et la même dose, l'un à la racine de la queue, l'autre dans la cavité générale; le 10, ils sont affaiblis, occupent le fond des aquariums.

Ils meurent spontanément, le premier le 13 septembre, le deuxième le 12 septembre. A l'autopsie, on note un empatement œdémateux aux points inoculés, une congestion marquée des reins et du foie. Le sang du cœur, aspiré dans des pipettes, est brunâtre et poisseux. La température diurne des aquariums oscillait, de janvier à septembre, entre 21° et 23°; elle subissait, pendant la nuit, des abaissements de 3° à 8° cent.

— Le 18 septembre, un hippocampe reçoit, à la racine de la queue, un demi-centimètre cube d'eau douce stérilisée dans laquelle on dilue une anse de culture sporulée sur gélose. L'animal meurt dans la nuit du 20 au 21 septembre. La température diurne variait de 21° à 18°.

— Un hippocampe est inoculé, le 20 septembre au matin, avec un demi-centimètre cube d'une culture datant de deux jours dans du bouillon de bœuf peptonisé. Placé, deux heures après, dans un large récipient d'eau de mer, bien aéré, contenu dans une étuve à 28°, l'animal est mort, complètement dépigmenté, le 21 au matin.

— Le 23 août 1894, deux hippocampes reçoivent dans la cavité générale un quart de centimètre cube d'un bouillon de culture récent; ils sont sacrifiés, l'un après l'autre, une heure et deux heures après l'injection. L'exsudat louche de la région inoculée — examiné en goutte pendante dans une solution aqueuse de bleu de méthylène, ou encore sur des lamelles desséchées à l'air libre, colorées au bleu, et montées avec précaution dans une goutte d'eau — montre un grand nombre de phénomènes de phagocytose.

TECHNIQUE

Les organes étaient étudiés :

1° Sur des frottis ;

2° Sur des coupes, après fixation par le sublimé, imprégnation au picro-carmin, inclusion dans la paraffine, coloration par les méthodes de Gram, Weigert ou simplement par le bleu de méthylène.

Nousensemencions sur gélose et dans du bouillon, en observant avec d'autant plus de rigueur les précautions d'asepsie que la pratique nous avait appris la fréquence des infections accidentelles lorsqu'on opère sur les poissons.

Les cultures récentes étaient ensuite, après constatation de leur pureté, inoculées à des lapins et à des rats noirs (*mus rattus*) qui fournissaient à leur tour de nouvelles récoltes dont on vérifiait la pureté.

L'ÉTAT ACTUEL DE LA QUESTION DE L'IMMUNITÉ

(Rapport au Congrès International de Budapest.)

PAR EL. METCHNIKOFF.

Le lien organique qui réunit ces Congrès internationaux m'oblige à prendre la parole sur la question de l'immunité, qui a été un des principaux thèmes de la discussion au dernier Congrès de Londres.

A la fin du débat, M. Buchner, qui soutenait la théorie humorale de l'immunité, a exprimé l'espérance « que le prochain congrès nous trouvera en possession de faits qui permettront de jeter sur le problème débattu une lumière beaucoup plus vive. » (*Münch. med. Woch.* 1891. p. 671). La question a été étudiée depuis avec beaucoup de zèle et par un grand nombre de savants distingués. Sous ce rapport l'espérance de M. Buchner n'a pas été déçue. Résumons donc, aussi brièvement que possible, les principaux progrès réalisés pendant ces trois dernières années.

Commençons par la théorie humorale de l'immunité et par sa modification, justement soutenue par M. Buchner lui-même, et connue sous le nom de la *théorie du pouvoir bactéricide des humeurs*.

On se figurait d'après cette théorie que les microbes, entrés dans l'organisme, y subissaient une influence plus ou moins nuisible des humeurs naturelles, telles que le plasma sanguin, le liquide des exsudats, l'humeur aqueuse etc. Si ces humeurs détruisaient les microbes, l'organisme restait indemne et les cadavres des microbes tués étaient simplement balayés et emportés par les leucocytes. Si au contraire les humeurs étaient incapables de détruire les microbes, ceux-ci se développaient librement dans l'organisme, dépourvu de toute immunité.

Ni avant le Congrès de Londres, ni dans ces trois dernières années, on n'a jamais pu fournir un seul exemple concret de cette action humorale dans l'organisme animal. Mais un grand nombre de faits recueillis s'opposait à l'admission de la théorie bactéricide. Je ne citerai que l'exemple fourni par M. Stern de l'action bactéricide du sang humain vis-à-vis du bacille de la fièvre typhoïde. Assez marquée dans le sang des personnes normales, cette action diminue notablement chez les individus guéris. Elle est donc, dans ce cas, diamétralement opposée à l'immunité.

Probablement sous l'influence de tous ces faits, M. Buchner s'est cru obligé de modifier sa théorie. Dans ses dernières publications (*Münch. med. Woch.* 1894.) il formule la conception suivante. La propriété bactéricide du sang est due surtout aux leucocytes qui dégagent des *alexines*, capables de détruire les microbes. Lorsque, dans un processus infectieux, il s'établit une inflammation avec une accumulation considérable de leucocytes, ces cellules interviennent non pas seulement pour englober les microbes morts, mais bien pour dégager d'abord le fluide microbicide. Comme cette accumulation des cellules mobiles se fait grâce à leur sensibilité, on voit bien que la nouvelle conception de M. Buchner n'est plus une théorie purement humorale. L'immunité n'est pas due à une action bactéricide des liquides, action purement passive, mais bien à une intervention active des leucocytes qui arrivent sur le champ de bataille pour dégager leurs alexines. La théorie de M. Buchner est donc devenue une théorie cellulaire, faite pour concilier les anciennes théories de l'immunité.

Dans cet éclectisme, M. Buchner a été précédé par d'autres savants. Trois auteurs anglais, MM. Hankin, Kanthack et Hardy, ont déjà formulé une opinion qui devait réconcilier les théories opposées de l'immunité. Ils ont admis que les alexines bactéricides étaient un produit de sécrétion des leucocytes éosinophiles. Les granulations éosinophiles dégagées par les cellules, d'après cette conception, tuent les microbes qui sont ensuite englobés et dissous par les leucocytes non éosinophiles. Cette théorie est définitivement réfutée par M. Mesnil, qui, dans un travail inédit exécuté dans mon laboratoire, a prouvé que chez certains poissons osseux et notamment chez la perche il n'existe pas du tout de granulations éosinophiles ni pseudo éosinophiles, et que malgré cela la destruction des microbes s'opère tout aussi bien par les phagocytes que chez les animaux doués de la plus grande quantité d'éléments éosinophiles.

Parmi les savants qui ont devancé M. Buchner dans la voie de la conciliation, je dois encore citer M. Denys et ses collaborateurs, qui ont tâché de démontrer le rôle des leucocytes dans la manifestation bactéricide du sang.

Voilà donc toute une série de tentatives qui démontrent l'impossibilité de persister dans la voie de la conception purement humorale de l'immunité.

Certains savants, qui voyaient bien que les microbes n'étaient pas détruits par les humeurs des animaux réfractaires, admettaient que les liquides de l'organisme suffisaient seulement à atténuer les bactéries. Ainsi naquit la *théorie de la propriété atténuante des humeurs*. Lorsqu'un partisan de cette théorie, M. Sanarelli, vint dans mon

laboratoire pour faire des recherches sur l'immunité, je le priai de s'occuper de l'atténuation par les humeurs, en choisissant le vibron de Gamaleïa (*V. Metchnikow*), pour lequel certains faits semblaient indiquer l'existence de cette propriété. Les recherches de M. Sanarelli, publiées en 1893, ont démontré que cette atténuation n'existe pas en réalité, et que les phénomènes qui en avaient fait naître l'idée, s'expliquent par l'intervention d'un pouvoir préventif du sérum des animaux vaccinés. Toute une série de recherches de mon laboratoire ont prouvé le même fait pour le microbe de la pneumo-enterite des porcs, pour le pneumo-coque (Issaëff) et pour le vibron cholérique.

A l'époque du Congrès de Londres, la découverte de M. Behring de la propriété antitoxique du sérum des animaux vaccinés contre le tétanos et la diphthérie était déjà connue, et acceptée unanimement comme une des plus grandes découvertes de ces derniers temps. Mais son application à la théorie de l'immunité était à peine commencée. Bientôt après le Congrès, parut le travail de MM. Klemperer qui tentèrent de donner une théorie de l'immunité de la pneumonie fibrineuse, basée sur la découverte des antitoxines. M. J. Klemperer devint un des plus ardents défenseurs de cette théorie du pouvoir antitoxique, qu'il appliqua aussi au choléra humain.

Je n'ai pas besoin d'insister longtemps sur l'impossibilité de soutenir cette théorie du rôle des antitoxines dans l'immunité. Comme l'avait déjà bien prévu M. Roux, dans son discours sur l'immunité au Congrès de Londres, la belle découverte de M. Behring ne pouvait nullement servir comme base d'une théorie générale de l'immunité. Des faits très nombreux, constatés depuis, ont pleinement confirmé cette opinion. Dans toute une série de maladies qui ont été étudiées sous ce rapport, l'étiologie n'a pu être nullement conciliée avec la théorie antitoxique. Il a d'abord été prouvé, pour l'immunité des lapins vis-à-vis du microbe de la pneumo-enterite des porcs, que ce phénomène ne tient pas du tout à une propriété antitoxique quelconque. Bientôt après M. Sanarelli fit la même constatation pour le vibron de Gamaleïa, si voisin du vibron cholérique. M. Issaëff a pu constater que même l'immunité acquise des lapins contre le pneumocoque, cette base fondamentale de la théorie des frères Klemperer, ne peut pas être attribuée à une influence antitoxique des humeurs.

Cette série de recherches, faites dans mon laboratoire, a été complétée par un travail important de MM. R. Pfeiffer et Wassermann, prouvant que l'immunité de l'homme contre le choléra et celle des cobayes contre la péritonite cholérique ne reposent nullement sur une propriété antitoxique du sang. Et ceci malgré le caractère éminemment toxique de ces maladies.

Mais même pour le tétanos et la diphtérie, ces deux infections qui ont servi de première base à la théorie antitoxique, celle-ci n'a pu suffire à expliquer l'immunité. Plus on a approfondi l'étude de ce phénomène, plus on a trouvé de faits inconciliables avec la théorie antitoxique. Je dois surtout mentionner ici une longue série de recherches de MM. Roux et Vaillard, qui ont constaté à maintes reprises que chez les animaux et l'homme, qui sont loin d'être réfractaires au tétanos, les humeurs peuvent acquérir un fort degré de propriété antitoxique.

L'auteur de la découverte de cette propriété, M. Behring lui-même, a été amené, à la suite de recherches minutieuses, à conclure que l'immunité dans le tétanos réside dans les propriétés cellulaires de l'organisme. M. Behring distingue la vraie immunité acquise ou « l'immunité active », d'après la terminologie de M. Ehrlich, de l'immunité passagère ou « passive ».

La première forme de l'immunité, la plus constante, est attribuée maintenant par M. Behring à une fonction cellulaire. Il n'y a que l'immunité passive, communiquée par l'injection des humeurs d'un animal vacciné à un animal neuf, que M. Behring considère comme purement humorale. D'après sa conception, il s'agit ici simplement d'un transport d'une partie de l'immunité acquise à un animal normal par l'intermédiaire du liquide sanguin.

Cette immunité passive, c'est-à-dire la prévention des infections à l'aide des humeurs, a été confirmée pour un grand nombre de maladies. Il a d'abord été constaté que cette propriété préventive du sang peut exister souvent tout à fait en dehors d'un pouvoir antitoxique quelconque.

L'étude des phénomènes qui se passent dans ce processus de prévention a démontré qu'il s'agit ici d'une action stimulante des humeurs des animaux vaccinés sur l'organisme traité, et notamment sur ses éléments cellulaires. Il a été prouvé que, sous l'influence du sang vacciné il se produit une forte leucocytose, et en général une forte réaction cellulaire. Cette idée d'une action stimulante des humeurs vaccinées a été confirmée par plusieurs séries de recherches, dont quelques-unes proviennent de l'école de M. Koch. Ainsi MM. R. Pfeiffer et Wassermann la soutiennent pour la péritonite cholérique des cobayes. MM. C. Fränkel et Sobernheim l'appliquent à la même maladie. Dans cet ordre de travaux, je dois surtout mentionner celui de M. Issaëff (fait à l'Institut de M. Koch à Berlin) qui a constaté que, pour empêcher la péritonite cholérique des cobayes, il suffit de leur injecter préalablement des liquides qui stimulent les leucocytes. Parmi ces substances se trouve le bouillon nutritif ordinaire, liquide qui est un excellent milieu de culture pour le vibrion cholérique.

On voit bien, d'après tout ce qui vient d'être rapporté, que les partisans des théories humorales ont dû en général abandonner leur point de vue primitif et se rapprocher plus ou moins de la conception cellulaire de l'immunité.

A la fin d'une revue très circonstanciée, pleine de modération et d'impartialité, M. Stern résume de la façon suivante l'état actuel de la question : « La conception humorale exclusive de l'immunité, — au moins dans la grande majorité des cas — est insuffisante. C'est précisément l'étude exacte de l'action du sang et des humeurs, privés de cellules, qui nous porte à admettre que l'immunité repose le plus souvent sur un changement des cellules mêmes ou de leurs fonctions. » (*Centr. f. allg. Pathol.* 1894, p. 263.)

Voici donc le principal progrès accompli depuis le Congrès de Londres dans l'étude de l'immunité. Sur le terrain cellulaire, le seul qui reste, la divergence des opinions est déjà plus facile à apaiser. *L'immunité se réduit à la sensibilité et à l'activité des éléments cellulaires de l'organisme.* Mais il faut se demander quelles catégories de cellules jouent ici le premier rôle et quelles sont les manifestations cellulaires dans l'immunité ?

Nous avons vu que même M. Buchner accepte maintenant un rôle important des leucocytes dans l'immunité. Un autre représentant de l'école de Munich, plus intransigeant encore, M. Emmerich, parle dans sa dernière publication (*Münch. med. Woch.* 1894, p. 622) des leucocytes, comme centres de la substance albuminoïde active qui provoque la guérison. Seulement, dans ces conceptions, l'englobement et la destruction intra-cellulaire des microbes ne jouent aucun rôle. C'est la théorie des phagocytes qui attribue une grande importance à ces fonctions cellulaires. Eh bien, peut-on considérer cette théorie comme répondant à l'ensemble des faits si nombreux, accumulés pendant ces trois dernières années ?

Fondée il y a onze ans, c'est-à-dire bien avant les théories humorales que nous avons analysées, la théorie des phagocytes a rencontré un grand nombre d'objections et a résisté à toute une série de tempêtes, provoquées par la découverte des vaccinations chimiques, de la propriété bactéricide et du pouvoir antitoxique des humeurs. Tous ces faits et un grand nombre d'autres, paraissaient d'abord fournir des difficultés insurmontables, et cependant la théorie des phagocytes, examinée de plus près, a pu être facilement conciliée avec eux.

Tandis que l'étude de la propriété bactéricide des humeurs se faisait surtout en dehors de l'organisme, la fonction phagocytaire des cellules était de préférence étudiée dans l'organisme même. De cette façon il a été établi que l'englobement des microbes par les phagocytes se fait

avec une rapidité qu'on ne pouvait jamais prévoir. M. Werigo a constaté qu'un assez grand nombre de bactériidies injectées dans le sang des lapins, est englobé par les cellules immédiatement après l'injection, et que la majorité de ces microbes se trouve dans les phagocytes au bout de peu de minutes. M. Borrel a confirmé ce fait pour le bacille de la tuberculose, dont un grand nombre est englobé par les leucocytes quelques minutes après l'inoculation intravasculaire. Ces données démontrent que les microbes, entrés dans l'organisme, sont, avec une vitesse extraordinaire, saisis par les cellules et soustraits à l'action directe des humeurs, ce qui corrobore l'opinion du rôle éminent des phagocytes.

Cette dernière conclusion est encore confirmée par la généralité des phénomènes phagocytaires dans l'immunité. Autrefois on pouvait supposer que la réaction phagocytaire était une règle soumise à des exceptions plus ou moins nombreuses, ce qui ne paraissait du tout étonnant, vu la complexité des phénomènes biologiques. Mais plus on a étudié cette question, plus on a dû se convaincre de la généralité de la phagocytose. Même dans les maladies les plus toxiques, comme le tétanos et la diphtérie, la réaction phagocytaire joue un très grand rôle. Ce fait a été rigoureusement établi par M. Vaillard et ses collaborateurs pour le tétanos. Pour ce qui concerne la diphtérie, M. Lubarsch¹ insistait sur la contradiction de la phagocytose avec l'immunité. Mais un travail que M. Gabritchewsky vient de faire dans mon laboratoire², prouve que l'immunité des lapins contre la diphtérie se trouve en parfait accord avec la théorie des phagocytes. Une autre exception, sur laquelle insiste M. Lubarsch, n'existe non plus en réalité. M. Lubarsch affirme que le bacille de la septicémie des souris, si abondant dans les leucocytes de ces animaux, des plus sensibles, n'est presque jamais englobé par les phagocytes de la grenouille, animal réfractaire. Or, M. Mesnil, dans un travail qui va paraître prochainement, a démontré, d'une façon très exacte, la grande extension de la phagocytose dans ce même exemple.

Dans un travail du laboratoire de M. Straus, deux de ses élèves ont affirmé que le développement du tubercule expérimental se fait en dépit des postulats de la théorie des phagocytes.

M. Borrel, dans deux mémoires sur le tubercule des poumons et des reins, a répondu à cette objection, et a complètement démontré l'application de la théorie des phagocytes à la tuberculose expérimentale.

On pouvait plus facilement supposer l'absence de la réaction pha-

1. *Ueb. Immunitat. Schutzimpfung*, 1892, p. 18.

2. Voir dans le numéro des *Annales*, p. 673.

gocytaire, dans les cas où des microbes, pathogènes pour les animaux supérieurs, entrent en rapport avec l'organisme des invertébrés. Quoi de plus simple, en effet, que d'accepter que les humeurs des mollusques ou des arthropodes soient complètement incapables de conserver à l'état vivant, la bactériidie charbonneuse, ce parasite exclusif des vertébrés à sang chaud. Ne connaît-on pas des mollusques capables de sécréter de l'acide sulfurique très fort? Eh bien, M. Karlinsky a constaté que la bactériidie, injectée dans le corps des escargots, y disparaissait au bout d'un temps très court, et que l'ensemencement du point d'inoculation et du sang, ne donnait aucune culture. Ce fait avait été cité comme objection contre la théorie des phagocytes. M. Lubarsch en joignit un autre, concernant les crustacés. Chez ces animaux, l'injection des bactériidies dans la circulation, est suivie de leur disparition complète au bout d'une période extrêmement courte. M. Kowalevsky¹, le célèbre zoologiste, a répondu récemment à ces objections. Les faits, signalés par MM. Karlinsky et Lubarsch sont exacts, mais leur interprétation ne l'est pas. En réalité, la disparition des bactériidies de la circulation n'est nullement due à la destruction de ces microbes, mais uniquement à leur englobement par des phagocytes, accumulés dans certains organes qu'on peut comparer aux ganglions lymphatiques et à la rate des vertébrés. Chez les escargots, les bactériidies englobées se conservent à l'état vivant et virulent pendant 48 heures, et chez les écrevisses même pendant 4 jours.

J'ai tenu à rapporter ces résultats dans mon aperçu, car les phénomènes phagocytaires chez les animaux inférieurs constituent la base fondamentale de toute la théorie. Des recherches nombreuses de plusieurs zoologistes distingués l'ont définitivement consolidée.

L'extension générale de la phagocytose a donc été établie par des recherches sur des animaux très différents et vis-à-vis des microbes des plus variés. Les bactéries, découvertes dans ces derniers temps, ont été également signalées comme se conformant à la règle. Le *coccobacille* de la peste orientale, qui vient d'être découvert, se trouve, dans les cas les moins graves, en grande quantité dans l'intérieur des phagocytes, comme en témoigne M. E. Roux. Le petit bacille de l'influenza, découvert par M. R. Pfeiffer, présente des rapports constants et très intéressants avec les leucocytes. Au début de la maladie la plupart de ces microbes sont libres, mais au fur et à mesure de la convalescence, leur englobement par les leucocytes devient de plus en plus considérable. Malheureusement M. Pfeiffer, qui depuis longtemps est un partisan très zélé des théories humorales, n'a pas fait d'expériences directes sur l'état dans lequel se trouvent les bacilles englobés.

1. *Mélanges biologiques de l'Acad. de Saint-Petersbourg*, 1894, t. XIII, p. 437.

Ce n'est que par analogie avec d'autres cas et en raison de la colorabilité normale de ces microbes, qu'on peut supposer qu'ils ont été englobés par les phagocytes à l'état vivant.

Pendant ces deux dernières années, où l'attention des bactériologistes a été attirée surtout vers le choléra, on s'est beaucoup occupé des phénomènes phagocytaires dans la péritonite des animaux, provoquée par le vibrion de Koch. Dans le premier travail, où cette maladie a été bien établie, M. R. Pfeiffer s'est posé sur le terrain exclusif de la théorie bactéricide des humeurs. Il pensait que les vibrions, pour manifester leur action toxique, étaient préalablement détruits par la force bactéricide du liquide de l'exsudat. Il niait alors complètement le rôle actif des phagocytes qu'il n'avait jamais vu non plus fonctionner dans le cas du vibrion de Gamaleïa, si analogue au choléra, (surtout pour ce qui concerne la péritonite expérimentale des cobayes). Dans son second travail, publié en collaboration avec M. Wassermann, M. Pfeiffer s'assura de l'intervention des phagocytes dans l'élimination des vibrions chez les cobayes réfractaires, mais il pensa que ces microbes n'étaient englobés qu'après avoir été détruits par un facteur extracellulaire, encore non déterminé. Dans le but d'élucider cette question, M. Issaëff ¹ entreprit dans le laboratoire et sous la direction de M. Pfeiffer une étude très circonstanciée. Il a pu se convaincre de la grande extension et de l'importance capitale de la réaction phagocytaire dans la péritonite cholérique des cobayes. Cette résistance remarquable qui est provoquée par une simple injection du bouillon, de la tuberculine ou de toute une série d'autres substances, s'explique, d'après M. Issaëff, par la stimulation des phagocytes qui s'incorporent les vibrions et débarrassent ainsi l'organisme de ces producteurs de poisons. M. R. Pfeiffer ² a accepté cette interprétation. Il attribue donc maintenant un rôle considérable aux phagocytes, mais il distingue entre la résistance passagère, due à l'injection du bouillon et d'autres substances, et la vraie immunité, provoquée par la vaccination avec le vibrion ou ses produits toxiques. Dans la première, ce sont les leucocytes qui préservent l'organisme, tandis que, dans la vraie immunité, la destruction des vibrions est due à d'autres facteurs. Dans son dernier travail sur ce sujet, qui vient de paraître ³, M. Pfeiffer insiste sur l'action bactéricide du liquide de l'exsudat péritonéal des cobayes *hypervaccinés* contre le vibrion cholérique. Voici les faits qu'il a constatés. Lorsqu'on injecte, dans le péritoine de ces cobayes hypervaccinés, des vibrions cholériques vivants, on trouve dans le liquide péritonéal, extrait peu de temps

1. *Zeitsch. für Hyg.*, t. XVI, 1894, p. 287.

2. *Ibid.*, 268.

3. *Ibid.*, t. XVIII, p. 1.

(10 à 20 minutes) après, très peu de leucocytes et une quantité de vibrions, devenus immobiles et transformés en petits globules sphériques. Au fur et à mesure que le nombre de ces globules diminue, celui des leucocytes augmente. Les mêmes phénomènes ont été constatés par M. Pfeiffer, lorsqu'il injectait dans le péritoine des cobayes neufs une certaine quantité de culture cholérique, mélangée avec du bouillon et du sérum sanguin de cobayes hypervaccinés.

Se basant sur ces faits, établis très exactement et à maintes reprises, M. R. Pfeiffer se fait la conception suivante du mécanisme intime de l'immunité. A la suite de l'injection des vibrions cholériques dans le péritoine des cobayes hypervaccinés, les cellules vivantes, probablement les éléments de l'endothélium, sécrètent un liquide qui tue les vibrions et les dissout au bout de peu de temps. Les leucocytes n'interviennent que tardivement et ne jouent qu'un rôle purement secondaire. M. Pfeiffer arrive à cette conclusion que « pour la péritonite cholérique des cobayes, la théorie des phagocytes doit être considérée comme définitivement erronée. » (p. 4).

Avant d'entrer dans la critique des déductions de M. Pfeiffer, je dois remarquer que sa conception de l'immunité rentre dans le cadre des théories cellulaires, analogues à celles que j'ai analysées plus haut. La destruction des vibrions n'est plus due au plasma sanguin, tel quel, (comme l'admettait autrefois M. Pfeiffer), mais bien à un liquide, sécrété par des cellules, irritées par l'invasion des microbes. M. Pfeiffer semble ne pas se douter que sa conception actuelle de l'immunité est tout-à-fait pareille à celle que M. Emmerich avait formulée en 1887 pour l'immunité des lapins vis-à-vis du bacille du rouget des porcs. Je n'ai pas besoin de reproduire ici la discussion au sujet de cette théorie qui a dû être abandonnée. Voyons jusqu'à quel point elle peut être soutenue pour le cas spécial de la péritonite cholérique des cobayes.

Dans mes études, j'ai pu me servir non seulement des animaux que j'avais vaccinés, mais encore du sérum des cobayes hypervaccinés que m'avait obligeamment offerts M. Pfeiffer lui-même. Je lui exprime ici toute ma gratitude pour son offre aimable et loyale.

Comme il était facile de prévoir, les faits, constatés par un observateur si consciencieux et si habile, se sont montrés parfaitement exacts. Les vibrions, injectés dans le péritoine des cobayes hypervaccinés, ont été trouvés dans le liquide, retiré au bout de quelques minutes, en grande partie transformés en globules immobiles et ronds. Le nombre de ces globules diminuait avec chaque prise nouvelle de l'exsudat, dans lequel les leucocytes devenaient au contraire chaque fois plus nombreux. Mais ce liquide péritonéal, conservé en goutte

suspendue à l'étuve, donnait toujours des cultures abondantes de vibrions. L'observation directe a démontré d'une façon irréfutable qu'au moins la grande majorité de ces globules se transforment dans ces conditions en vibrions immobiles, souvent en des formes de spirilles. Par contre je n'ai jamais observé de dissolution des globules dans le liquide péritonéal. En parfaite harmonie avec ces constatations s'est trouvé le fait que les microbes cholériques se conservent dans le péritoine des cobayes hypervaccinés à l'état vivant pendant des heures.

Les vibrions cholériques d'Inovraclaw que m'avait obligeamment envoyés M. Pfeiffer, et dont une anse de platine de culture sur gélose (également préparée par M. Pfeiffer), mélangée avec 1 c. c. de bouillon et 0,2 c. c. de sérum des cobayes hypervaccinés par M. Pfeiffer, est injectée dans le péritoine d'un cobaye neuf, se retrouvent, au bout de très peu de temps, dans le liquide retiré, sous forme de globules immobiles. Mais cela n'empêche pas que l'exsudat péritonéal des mêmes cobayes ne fournisse des cultures pures du vibron cholérique, même lorsque le liquide, rempli de leucocytes, avait été retiré sept heures après le début de l'expérience.

En suivant rigoureusement les règles prescrites par M. Pfeiffer, j'ai donc pu m'assurer que les vibrions cholériques, dans le péritoine des cobayes hypervaccinés ou dans celui des cobayes neufs qui ont reçu le sérum hypervacciné, restent vivants pendant plusieurs heures. Le liquide péritonéal, dans lequel on ne trouve que de rares vibrions englobés par les leucocytes, donne encore des cultures abondantes. Le plasma de l'exsudat était donc incapable de tuer les microbes.

Cette transformation des vibrions en globules immobiles doit pourtant être analysée. D'après M. Pfeiffer, les leucocytes n'y sont pour rien, parce qu'ils sont encore trop rares dans « l'exsudat péritonéal ». L'action doit être plutôt attribuée, pense M. Pfeiffer, à une sécrétion des cellules endothéliales. Dans ces réflexions, mon savant contradicteur ne tient pas du tout compte de ce fait que le péritoine des cobayes renferme de la lymphe, très riche en leucocytes. Il est vrai que lorsqu'on n'en retire qu'une toute petite goutte, elle peut se présenter très pauvre en globules blancs; mais il suffit d'en retirer davantage, pour s'assurer de sa richesse en ces éléments. Lorsque le processus de la réaction contre l'injection péritonéale des vibrions est plus avancée, il arrive aussi qu'une goutte du liquide retiré se présente pauvre en leucocytes. Mais, en sacrifiant l'animal, on trouve des pseudo membranes qui recouvrent le foie et le mésentère, et qui sont composées d'une quantité énorme de ces phagocytes.

L'observation directe nous prouve aussi que les leucocytes de la lymphe péritonéale ne doivent nullement être exclus comme facteur

dans la transformation des vibrions en globules. Lorsqu'on retire le liquide péritonéal, déjà cinq minutes après l'injection des vibrions, mélangés avec le sérum préparé par M. Pfeiffer, on est frappé par le phénomène suivant : les leucocytes se montrent entourés d'une couche de vibrions, en grande partie déjà transformés en globules. Tandis que les leucocytes polynucléaires, mononucléaires et même les éosinophiles, sont enveloppés d'une masse épaisse de ces microbes, les lymphocytes et les globules rouges restent complètement nus, et ne sont entourés d'aucun microbe. Ce fait, que j'ai constaté à plusieurs reprises, démontre l'existence d'une action chimiotactique des leucocytes dénommés vis-à-vis des vibrions cholériques. Ces cellules attirent donc les microbes. Pour arriver jusqu'à elles, les vibrions ont dû nager dans le plasma de la lymphe; ce n'est qu'au voisinage intime des leucocytes qu'ils ont perdu leur mobilité. L'action de ces cellules sur les vibrions est donc incontestable. En observant le phénomène pendant un temps plus long, on constate une zone transparente entre la couche des vibrions et la surface des leucocytes. Il y a donc quelque production du liquide autour des globules blancs. Est-ce une sécrétion véritable? Il est difficile de l'affirmer, parce que tous les leucocytes qu'on trouve dans ces conditions, sont complètement immobiles et paraissent par conséquent morts. La question de savoir si cette mort des leucocytes s'opère déjà dans l'animal, où bien ne survient qu'au moment de l'extraction du liquide péritonéal, demande des recherches spéciales.

Il extrêmement probable que le pouvoir bactéricide du sérum sanguin des cobayes vaccinés, constaté par MM. Behring et Nissen pour le vibrion de Gamaleïa, et par M. Zäsléin pour le vibrion de Koch, est la manifestation de la même propriété. Or, il devient de plus en plus admissible que dans ces cas la propriété bactéricide est en dernière instance liée aux leucocytes. Les recherches, exécutées par M. J. Bordet dans mon laboratoire, aboutissent précisément à cette conclusion.

Voici donc comment on peut interpréter les phénomènes observés par M. R. Pfeiffer: les phagocytes des cobayes vaccinés élaborent dans leur intérieur des substances capables de tuer les vibrions. A l'état de hypervaccination, ces substances deviennent tellement abondantes qu'elles peuvent facilement s'échapper au dehors. Il se produit ici quelque chose d'analogue avec ce que l'on observe dans la digestion. Chez les animaux inférieurs la digestion est entièrement intracellulaire; mais avec la marche progressive de l'évolution, elle devient d'abord mixte, intracellulaire et en partie extracellulaire. Théoriquement parlant, on pourrait peut-être amener tous les phagocytes, et peut-être même les autres cellules, à sécréter leurs substances

bactéricides et transformer ainsi la destruction intra cellulaire des microbes en une destruction extracellulaire. Seulement, en réalité, on est encore loin de cet idéal. Et même dans le cas spécial étudié par M. Pfeiffer, comme nous avons vu, il ne s'agit que d'une action bactéricide médiocre du liquide leucocytaire. Je dois insister surtout sur ce fait que j'ai constaté un très grand nombre de fois, et aussi chez des cobayes hypervaccinés contre le vibrion cholérique, que le liquide ne renfermant que des microbes englobés dans des phagocytes, donne des cultures pures. Introduit à l'étuve sous forme de goutte suspendue, ce liquide présente le phénomène que j'ai déjà décrit plusieurs fois et qui a encore tout récemment été confirmé par M. Cantacuzène ¹. Les leucocytes, morts dans ces conditions, se gonflent et se transforment en des sacs remplis de vibrions qui finissent par envahir toute la goutte. Cette expérience montre que les microbes ont été englobés à l'état vivant, et que toutes les forces bactéricides extracellulaires étaient impuissantes à tuer toutes les bactéries. J'insiste sur ce fait, comme objection principale à la nouvelle interprétation de M. R. Pfeiffer, ainsi qu'à toutes les autres théories humorales ou humoro-cellulaires, et entre autres à la nouvelle théorie de M. Buchner, mentionnée au début de cette Revue. Dans un travail particulier je tâcherai de répondre en détail aux conclusions de M. Pfeiffer. Ici je me bornerai à lui dire que même ses propres recherches et celles auxquelles il a assisté (Issaëff), ne justifient nullement son opinion sur la non application de la théorie des phagocytes à la péritonite cholérique des cobayes. Même en partageant complètement sa manière de voir, on doit reconnaître qu'elle ne s'applique que pour quelques cas spéciaux de cette affection. Pour observer les phénomènes de dégénérescence extracellulaire des vibrions M. Pfeiffer a dû recourir à des cobayes hypervaccinés (*hochimmunisirte*), car les animaux résistants à la suite de la vaccination ordinaire ne montrent que le processus habituel de la réaction phagocytaire. Comme exemple de l'immunité naturelle, due à une influence des liquides, M. Pfeiffer cite des cobayes, dans la cavité péritonéale desquels il injectait une culture de vibrions, cultivés pendant 7 ans sur des milieux artificiels, et devenue absolument inoffensive pour les animaux. Dans ce cas « les vibrions disparaissent en 20 à 30 minutes, sans un concours considérable de phagocytes ». Précisément, cette circonstance, que M. Pfeiffer a dû s'adresser à une variété cholérique aussi modifiée pour démontrer le rôle bactéricide du plasma, démontre clairement qu'avec d'autres cultures les choses se passent tout autrement. Eh bien, on a pour ainsi dire chaque

1. *Recherches sur le mode de destruction du vibrion cholérique dans l'organisme.* Paris 1894.

jour occasion d'observer l'immunité naturelle des cobayes vis-à-vis des vibrions cholériques, même des plus virulents (en se servant de faibles doses ou bien en injectant sous la peau) et on constate facilement que ce ne sont pas les phénomènes phagocytaires qui manquent dans ces conditions.

Comme la majorité des cas d'immunité naturelle et d'immunité acquise (vaccination simple) vis-à-vis du vibron cholérique, reposent sur une réaction purement phagocytaire, on n'a pas le droit d'affirmer, comme le fait M. Pfeiffer, que la péritonite cholérique des cobayes soit en désaccord avec la théorie des phagocytes. Cet argument des vibrions, affaiblis pendant sept années de culture, pour prouver la non intervention des phagocytes, correspondrait à dire que les vibrions cholériques ne poussent pas sur la gélatine alcaline, parce qu'il y a des vibrions dégénérés qui ne se développent pas sur ce milieu.

La théorie des phagocytes, malgré l'affirmation de M. Pfeiffer, s'applique très bien à la péritonite cholérique des cobayes, comme elle s'applique à un très grand nombre de phénomènes de résistance de l'organisme contre l'invasion des microbes en général. On a même essayé de pénétrer plus profondément dans le mécanisme de l'action des phagocytes. Je dois mentionner ici la tentative de M. A. Kossel, d'expliquer la fonction bactéricide de l'acide nucléique, qui n'agit que dans un milieu acide, par la supposition que cette substance tue les microbes dans l'intérieur des cellules. Or, on sait que dans ces conditions l'acidité se conserve dans les vacuoles intracellulaires, tandis que dans les liquides de l'organisme animal l'acide est immédiatement neutralisé.

Bien que l'hypothèse si ingénieuse de M. Kossel soit très probable *a priori*, il faut admettre que la destruction intracellulaire des microbes peut se faire aussi dans un milieu alcalin. Comme exemple, je puis citer le cas de la dégénérescence des bacilles tuberculeux dans les cellules géantes de la gerbille, où la sécrétion de phosphate de chaux et les réactifs divers démontrent la réaction fortement alcaline du contenu cellulaire.

Des recherches nombreuses, faites dans ces dernières années, résulte non seulement la grande généralité de la phagocytose, comme moyen de destruction des microbes, mais encore l'extension du rôle des phagocytes en dehors de l'englobement des corps solides. La grande sensibilité de ces cellules vis-à-vis des produits solubles des microbes, faisait supposer une action des phagocytes sur les toxines. M. Chatenay ¹ a fait dans mon laboratoire une étude sur la

1. *Les réactions leucocytaires vis-à-vis de certaines toxines végétales et animales.* Paris, 1894.

réaction leucocytaire des animaux empoisonnés par des toxines bactériennes (diphthérie et tétanine), phanérogamiques (ricine et abrine) et animales (venin des serpents). Il a pu constater une grande analogie avec les phénomènes connus dans les infections bactériennes. Lorsque la mort survient au bout de très peu de temps, le nombre des leucocytes diminue; s'il y a une survie au delà de vingt-quatre heures ou une résistance définitive, il se produit une hyperleucocytose plus ou moins prononcée.

J'ai étudié la leucocytose des lapins, empoisonnés par l'acide arsénieux, et j'ai pu également constater une hypoleucocytose prononcée dans des cas mortels. Mais chez les animaux accoutumés à l'arsenic, les mêmes doses qui amenaient l'hypoleucocytose et la mort des lapins témoins, produisaient une augmentation considérable du nombre des leucocytes. Ces expériences, prouvant d'un côté la réaction leucocytaire contre les poisons, démontrent de l'autre côté que l'hyperleucocytose peut être provoquée non seulement par les protéines, mais aussi par des substances sûrement toxiques.

Dans cet ordre d'idées, je dois signaler les faits très intéressants réunis par l'école de M. Kobert à Dorpat. Après avoir introduit dans l'organisme de différents animaux une préparation de fer très soluble (saccharate de fer oxydé du docteur Horneman; *ferrum oxydatum saccharatum solubile*), ne précipitant pas dans les milieux alcalins, M. Kobert et ses élèves, Stender, Samoïloff, Lipsky et autres ¹, ont suivi la circulation du métal dans les tissus. Ils ont constaté qu'une faible quantité de fer est éliminée par les reins et la paroi intestinale, mais que la plus grande partie du métal est arrêtée dans les organes, surtout dans le foie, la rate et la moelle des os. Le fer y est absorbé par les leucocytes qui le fixent pour longtemps et le déversent dans l'intestin, dans lequel ils se dirigent, poussés par une force encore inconnue (*l. c.*, ix, p. 82).

J'ai eu l'occasion d'observer cette circulation du sel soluble du docteur Hornemann dans l'organisme de plusieurs espèces de vertébrés. Quelques temps après son introduction dans l'organisme par voie sanguine, péritonéale ou sous-cutanée, on trouve le fer (à l'aide de la réaction microchimique avec le ferrocyanure de potassium) accumulé dans les diverses catégories des phagocytes, notamment dans les leucocytes, les cellules endothéliales du foie et les cellules de la pulpe splénique. Les cellules qui ne remplissent pas de fonctions phagocytaires, comme par exemple les leucocytes basophiles d'Erlich, si abondants dans la lymphe des rats, ne se chargent que fort peu de

1. *Arbeiten d. pharmacologischen Instituts zu Dorpat.* VII - x, 1893, 1894.

fer, tandis que les leucocytes polynucléaires et les grands mononucléaires en sont remplis.

MM. Charrin et Carnot¹ ont constaté tout récemment que le plomb se dépose de préférence dans les organes lésés, mais ils n'admettent pas dans ce cas le transport par les leucocytes, car le pus ne donne pas la réaction de plomb. Il est probable que cette contradiction n'est qu'apparente : les cellules mortes du pus sont incapables d'absorber le métal, mais ce sont vraisemblablement d'autres phagocytes, peut-être des cellules endothéliales des parties lésées, qui accomplissent la résorption. Dans tous les cas, les résultats des recherches sur la circulation de fer, qui ont été étendus par M. Samoiloff², de l'école de Dorpat, aux sels solubles d'argent, démontrent le grand rôle que jouent les éléments phagocytaires dans l'absorption et le transport des métaux. Cela suffit pour attribuer à ces cellules une grande importance, comme centres thérapeutiques de l'organisme. Les phénomènes leucocytaires dans les empoisonnements par les toxines organiques, dans l'accoutumance de l'organisme vis-à-vis de l'arsenic, corroborent cette conclusion. D'un autre côté, ce résultat que, dans la prévention et la thérapeutique des infections à l'aide des sérums, il s'agit d'une stimulation de la résistance cellulaire, montre une fois de plus la vaste étendue qu'occupent, dans les phénomènes de guérison et d'immunité, les fonctions relatives des cellules en général et des phagocytes en particulier.

Arrivés à la fin de notre aperçu, nous devons constater la victoire de la théorie cellulaire de l'immunité et l'échec des théories purement humorales, et insister sur ce résultat général que l'immunité dans les maladies infectieuses est due à l'activité des cellules vivantes de l'organisme. Parmi ces éléments, le premier rôle doit être sûrement attribué aux phagocytes.

Résumé du rapport sur l'immunité.

1. Les représentants des théories humorales de l'immunité ont modifié leur conception. En attribuant la propriété bactéricide à des produits des leucocytes et en admettant que ces cellules se dirigent, à la suite de leur sensibilité, vers les points envahis par les microbes ; M. Buchner se rapproche de l'interprétation cellulaire de l'immunité ;

2. En supposant que l'immunité est due à des liquides sécrétés par les cellules endothéliales, excitées par les microbes, M. R. Pfeiffer rétablit la théorie abandonnée de M. Emmerich, et modifie son ancienne conception purement humorale dans le sens de la théorie cellulaire ;

1. *Semaine médicale* 1894, p. 385.

2. *Arch. d. pharm. Inst. Dorpat*. IX, 1893, p. 27.

3. En admettant qu'en dehors de l'immunité passive, attribuable aux humeurs, il existe une immunité active, durable, due à une fonction cellulaire, M. Behring se range aussi du côté des partisans des théories cellulaires;

4. Mais l'immunité passive, provoquée par le sérum vacciné ou par d'autres substances préventives (bouillon, tuberculine, etc.), se réduit aussi à une stimulation de la réaction cellulaire. Il devient de plus en plus probable que même l'action antitoxique des humeurs repose non sur la destruction des toxines, mais aussi sur l'excitation de la défense cellulaire;

5. La théorie, d'après laquelle les bactéries seraient détruites par des sécrétions des leucocytes éosinophiles, est réfutée par des faits précis;

6. La théorie des phagocytes se trouve en harmonie avec tous les faits établis depuis sa fondation;

7. Les exemples qui ont été invoqués comme exceptions de la fonction phagocytaire : septicémie des souris, diphtérie, charbon chez les crustacés et les mollusques, après un examen approfondi, rentrent bien dans les cadres de la théorie des phagocytes;

8. La péritonite cholérique des cobayes rentre aussi dans la catégorie des maladies infectieuses, dans lesquelles la fonction antibactérienne des phagocytes est des plus évidentes. Les phénomènes de dégénérescence des vibrions dans le liquide péritonéal chez des cobayes hypervaccinés, phénomènes décrits par M. R. Pfeiffer, s'expliquent par une action des produits des leucocytes, modifiés sous l'influence de l'hypervaccination;

9. La destruction des microbes dans l'intérieur des phagocytes peut se faire dans un milieu acide, conformément à l'opinion de M. A. Kossel sur l'action de ses acides nucléiques. Mais cette destruction peut se faire aussi dans un milieu alcalin, dans le contenu des phagocytes;

10. Les phagocytes réagissent non seulement contre l'invasion des microbes, mais aussi dans les intoxications de l'organisme par divers poisons. Leur rôle a été mis en évidence (surtout par l'école de M. Kobert) même pour des substances inorganiques, telles que le fer et l'argent;

11. D'après tout l'ensemble des progrès accomplis dans ces dernières années, il faut considérer l'immunité comme le résultat d'une activité cellulaire;

12. Parmi les éléments qui fonctionnent dans l'immunité, le premier rôle doit être attribué aux phagocytes.

SUR LES SÉRUMS ANTITOXIQUES

Communication faite au Congrès de Budapest

PAR M. E. ROUX

Il n'est pas actuellement de question plus intéressante pour le biologiste et le médecin que celle des sérums préventifs et thérapeutiques. Elle est née avec les expériences de Maurice Raynaud sur le sang des génisses inoculées du Cow-pox, et avec celles de MM. Richet et Héricourt sur le sérum des chiens et des lapins vaccinés contre une septicémie spéciale. Mais son importance n'a été comprise qu'après les travaux de MM. Behring et Kitasato sur le tétanos et la diphtérie. La sérum-thérapie vient de nous donner un traitement efficace de cette dernière maladie; elle a donc un intérêt pratique aussi grand que scientifique.

Depuis la découverte de M. Behring, on a constaté que le sérum des animaux immunisés contre diverses maladies contagieuses est préventif et thérapeutique. Il en est ainsi pour le sérum des animaux vaccinés contre la pneumonie, le choléra, etc.; c'est donc là une propriété assez générale. Ces qualités des sérums ont été expliquées par l'action neutralisante qu'ils exercent sur les poisons microbiens. Qui ne connaît la belle expérience qui consiste à faire voir que la toxine tétanique et la toxine diphtérique cessent d'être nocives quand elles sont mélangées avec un peu de sérum d'un animal vacciné contre le tétanos ou la diphtérie? Mais ce pouvoir antitoxique, si marqué dans les sérums antitétanique et antidiphtérique, ne se retrouve plus dans le sang des animaux vaccinés contre les autres maladies que nous avons énumérées. Le sérum des lapins rendus réfractaires au hog-choléra ou à l'infection pneumonique, pas plus que celui des cobayes vaccinés contre le choléra ou le vibron avicide, ne manifeste aucun pouvoir antitoxique, ni *in vitro*, ni dans l'organisme. Ce fait est bien acquis depuis les recherches de M. Metchnikoff sur le hog-choléra, de M. Issaef sur la pneumonie, de M. Pfeiffer sur le choléra, de M. Sanarelli sur le vibron avicide et la fièvre typhoïde. Les animaux immunisés sont tout aussi sensibles au poison de ces maladies que les animaux neufs. Leur sérum ne protège pas contre la toxine, mais contre le microbe. M. Metchnikoff en a trouvé la raison dans ce fait que ces

sérums sont des stimulants des cellules phagocytaires, qui englobent alors les microbes introduits et les détruisent par une véritable digestion. La maladie est réduite à une lutte locale.

Puisque ces sérums préventifs agissent comme des stimulants cellulaires, on comprend que le sérum d'un animal vacciné contre une maladie puisse être efficace contre une autre. Dans ces derniers temps, M. Duntzman a constaté que le sérum des animaux immunisés contre le charbon symptomatique agit sur le bacille de la septicémie aiguë. D'ailleurs, le sérum de l'homme sain, et parfois aussi celui du cheval, comme l'a montré M. Pfeiffer, ont des propriétés immunisantes très marquées contre l'infection cholérique intra-péritonéale. Il semble donc que ce pouvoir préventif du sérum contre les virus vivants ne soit pas toujours spécifique, puisqu'il se rencontre chez des animaux qui n'ont jamais éprouvé l'action du microbe contre lequel leur sang protège. Il n'y a rien là de bien surprenant, puisque, suivant l'expression de M. Metchnikoff, il s'agit non pas d'« antitoxines » mais de « stimulines », dont plusieurs seraient capables d'un même effet.

Mais préserver contre un microbe vivant, qui doit se développer avant d'agir, est tout autre chose que de préserver contre une toxine. Jusqu'ici nous ne connaissons que le sérum des animaux immunisés contre le tétanos, la diphtérie, l'abrine, la ricine et le venin des serpents qui soient antitoxiques. Ce pouvoir antitoxique s'affirme alors avec une telle puissance que, pour le tétanos par exemple, il dépasse l'imagination.

Comment se forment ces antitoxines ? Elles sont d'autant plus abondantes dans le sang des animaux que ceux-ci ont reçu plus de toxine, d'où l'idée très naturelle que l'antitoxine dérive de la toxine par une transformation produite dans le corps. Les propriétés si semblables de la toxine et de l'antitoxine venaient à l'appui de cette supposition. De plus, quand on cesse d'injecter de la toxine aux animaux, l'antitoxine diminue peu à peu dans leur sang, comme si la matière d'où elle provient n'était plus renouvelée. Une conséquence de cette hypothèse, c'est que la quantité d'antitoxine dans le sang doit être en proportion de la toxine introduite. Si donc on saigne fréquemment les animaux immunisés, sans leur injecter de nouvelle toxine, la provision d'antitoxine devra s'épuiser rapidement. Avec M. Vaillard nous avons vu qu'il n'en est rien ; on peut retirer en très peu de temps, à un lapin vacciné contre le tétanos, un volume de sang égal au volume total de celui qui circule dans son corps, sans que le pouvoir antitoxique du sérum baisse sensiblement. L'antitoxine se reproduit donc au fur et à mesure qu'on la puise. Et d'ailleurs, une autre expérience

que nous avons faite avec M. Vaillard prouve qu'il n'y a pas proportionnalité entre la toxine injectée et l'antitoxine produite. Avec la même dose de toxine donnée aux animaux, on peut obtenir un sérum plus ou moins actif, suivant la façon dont on l'administre. Prenons deux lapins de même poids et immunisons-les contre le tétanos ; quand leur résistance est déjà notable, injectons-leur la même quantité de toxine (103 c. c.) dans l'espace de deux mois, en donnant à l'un, tous les jours, une faible quantité, et à l'autre, de temps en temps, des doses plus fortes. Dans le même temps, nos deux animaux ont reçu le même volume de poison ; le premier en 33 petites injections, le second en 9 grandes. Le sérum de celui aux faibles doses neutralise, *in vitro*, 150 parties de toxine et possède un pouvoir préventif de cent milliards, le sérum de celui aux doses massives ne neutralise pas 25 parties de toxine et son pouvoir préventif ne dépasse pas cinq cent mille. La manière de donner la toxine n'est pas indifférente, et la quantité de l'antitoxine dans le sang n'est pas proportionnelle à la dose introduite. Avec des petites doses répétées, nous avons obtenu des sérums antitétaniques dont l'activité dépasse un trillion, et cela dans un temps relativement court. Il semble que la toxine agisse comme un excitant sur les cellules qui sécrètent l'antitoxine.

Cette idée que l'antitoxine est un produit cellulaire trouve un appui dans l'intéressante constatation de M. F. Klemperer, qui a vu que le jaune de l'œuf de la poule immunisée est antitoxique, tandis que le blanc ne l'est pas. Quelles sont les cellules du corps qui préparent ces antitoxines ? C'est une question trop peu avancée pour être exposée ici.

L'expérience, dans laquelle le pouvoir antitoxique se manifeste avec le plus de netteté, est celle où l'on mélange le sérum antitétanique avec la toxine. Versons dans une série de verres un volume connu d'une toxine très active (qui tue une souris à la dose de $1/1000^e$ de cent. cube) et ajoutons dans chacun des quantités variables du sérum antitoxique dont nous parlions tout à l'heure, et dont le pouvoir préventif égale un trillion. Une partie de ce sérum suffit à rendre inoffensives 900 parties de toxine ; un demi c. c. du mélange injecté à un cobaye ne lui donne pas le tétanos, bien qu'il ne renferme qu'un dix-huit centième de c. c. de sérum. Le poison paraît donc neutralisé comme dans une réaction chimique, où une quantité donnée d'un corps sature une quantité donnée d'un autre. Les choses ne se passent pas avec cette simplicité. D'abord, rien n'est plus difficile que de saisir le point exact de la saturation. M. Buchner a déjà vu qu'un mélange qui n'agit pas sur la souris est actif sur le cobaye. Un mélange de 900 parties de toxine et d'une de sérum est inoffensif à la dose d'un demi c. c. pour 8 cobayes sur 10 ; mais il en est

2 dans le lot qui prendront un tétanos plus ou moins sévère et se comporteront comme des réactifs plus sensibles, en montrant qu'il y a encore du poison libre dans la liqueur. Diminuons la proportion de toxine et mêlons 500 parties de toxine avec une de sérum. Un demi c. c. de ce nouveau mélange ne produit aucun effet, mais 3 c. c. donneront le tétanos. Il n'y a pas là la netteté d'une réaction chimique, soit que nous manquions d'un réactif suffisant pour nous indiquer le point exact de saturation, soit peut-être qu'il n'y ait pas de saturation et que toxine et antitoxine continuent à exister côte à côte.

Les expériences suivantes, que nous avons faites avec M. Vaillard, tendent à prouver qu'il en est ainsi. Nous injectons à cinq cobayes neufs 1/2 c. c. du mélange : toxine 900 parties, sérum 1 partie; aucun ne prend le tétanos. A cinq autres cobayes, de même poids, ayant les meilleures apparences de santé, mais qui ont été immunisés quelque temps auparavant contre le vibrion de Massauah, nous donnons le même liquide, à la même dose; ils auront le tétanos. Bien plus, de semblables cobayes pourront être rendus tétaniques avec 1/3 de c. c. d'un mélange de 500 parties de toxine pour 1 de sérum. Des cochons d'Inde qui reçoivent d'abord 1 c. c. de sérum préventif, actif au trillionième, c'est-à-dire une quantité capable de les immuniser des milliers de fois, puis une dose mortelle de toxine tétanique, restent bien portants dans les conditions ordinaires. Plusieurs d'entre eux prendront le tétanos, si on leur injecte ensuite des produits microbiens tels que ceux du bacille de Kiel, du *bacterium coli*, et d'autres bactéries. La toxine n'est donc pas détruite puisqu'elle donne le tétanos, même après plusieurs jours, aux cobayes dont on modifie la résistance.

De même, une quantité de sérum antidiphthérique, amplement suffisante à préserver des cobayes neufs contre une dose mortelle de toxine, ne retarde pas la mort des cobayes, de même poids, qui ont subi des inoculations antérieures dont ils sont parfaitement rétablis. Et cependant si l'antitoxine détruisait la toxine, la même quantité de sérum serait efficace chez tous les cobayes du même poids.

Ces faits montrent l'influence que peut avoir une maladie antérieure, qui ne laisse pas de traces apparentes, sur la réceptivité à l'égard des virus et sur la sensibilité vis-à-vis des substances toxiques. Leur explication naturelle n'est-elle pas dans l'action du sérum sur les cellules plutôt que sur la toxine? Les cellules bien vivaces des cobayes neufs répondent à la stimulation du sérum et sont comme indifférentes à la toxine, tandis que celles des cobayes déjà impressionnés par les produits microbiens ne lui résistent pas.

Notre démonstration serait plus persuasive, si nous arrivions à séparer la toxine de son mélange avec l'antitoxine. Les propriétés très

voisines de ces deux substances rendent le problème difficile à résoudre. Les toxines et les antitoxines du tétanos et de la diphtérie se comportent de la même façon en présence des divers agents et des réactifs. Mais la séparation peut être faite pour d'autres toxines.

MM. Calmette, Phisalix et Bertrand ont montré que le sérum des animaux immunisés contre le venin des serpents est antitoxique; il agit sur le venin comme le sérum antitétanique sur le poison du tétanos. Le mélange de sérum antivenimeux et de venin est inoffensif, quand il est fait en proportions convenables: on lui rend toute sa toxicité en le chauffant à 70°. A cette température, l'antitoxine est altérée et le venin ne l'est pas. La chaleur agit sur le mélange des deux substances comme si chacune était seule. Il paraît donc que le venin était resté intact à côté de l'antitoxine, ou, tout au moins, qu'il avait contracté avec elle une union bien instable.

De tout ce qui précède, nous sommes portés à conclure que les antitoxines agissent sur les cellules. Un sérum préventif contre une toxine met en jeu des actions cellulaires, tout comme le sérum préventif contre un virus vivant. Peut-être même les cellules qui détruisent les microbes sont-elles aussi celles qui élaborent les antitoxines?

Nous avons rappelé, au commencement de cette note, que le sérum d'un animal vacciné contre un microbe protège quelquefois contre un autre, et que les sérums préventifs contre un virus vivant n'étaient pas toujours spécifiques. Jusqu'ici, au contraire, les sérums antitoxiques ont été envisagés comme rigoureusement spécifiques, chacun d'eux n'agissant que sur une toxine déterminée. Le fait que l'antitoxine tétanique n'a aucune influence sur le poison diphtérique et réciproquement, a toujours été mis en avant pour prouver cette spécificité. La découverte de nouvelles antitoxines a élargi le champ de l'expérimentation. J'ai constaté que le sérum antitétanique n'était pas sans action sur le venin de serpent, et j'ai confié le soin d'examiner cette question à M. le Dr Calmette qui étudie, dans mon laboratoire, la sérum-thérapie des venins. Les résultats obtenus sont intéressants au point de vue général qui nous occupe.

Le sérum d'un cheval sain, mélangé à du venin de cobra, n'empêche nullement celui-ci d'agir, tandis que le sérum d'un cheval immunisé contre le tétanos rend inoffensif le venin auquel on l'ajoute. Ce sérum antitétanique, injecté avant le venin, retarde beaucoup la mort et l'empêche même, s'il est donné à doses répétées. Il y a cependant bien peu de ressemblance entre le venin des serpents, qui tue par asphyxie, en un temps très court, et le poison tétanique qui ne manifeste son action qu'après une période d'incubation.

Le sérum antitétanique est antitoxique vis-à-vis du venin, mais le

sérum antivenimeux ne l'est pas à l'égard de la toxine tétanique. Un lapin vacciné contre le venin prend le tétanos et, fait plus surprenant, un lapin immunisé contre le tétanos succombe si on lui donne une dose de venin très peu supérieure à celle qui tue un lapin neuf.

Le sérum des lapins neufs n'a aucune action sur le venin, celui des lapins vaccinés contre la rage est antivenimeux à un haut degré. Mélangé au venin *in vitro*, il le rend inoffensif; injecté préventivement, il protège contre l'envenimation. Des lapins, vaccinés contre la rage, supportent des doses 4 et 5 fois mortelles de venin. N'est-il pas surprenant de voir qu'en rendant un lapin réfractaire à la rage, on lui donne du même coup l'immunité contre les morsures de serpent?

Le sérum antivenimeux rend les lapins plus résistants à l'abrine, et le sérum anti-abrique a aussi une action sur les venins. Le sérum antidiphthérique, mélangé à l'abrine, ne tue plus les lapins qu'avec un long retard. Assurément, le sérum antitétanique est beaucoup plus efficace contre le poison du tétanos que contre les venins; mais ce ne sont là que des questions de plus ou de moins. Il ne paraît pas probable que des sérums, d'origines si diverses, exercent sur le venin de cobra une même action chimique : nous admettons, plus volontiers, qu'ils agissent tous sur les cellules, en les rendant insensibles, pour un temps, à l'envenimation.

Je pourrais donner encore d'autres exemples de l'action d'une antitoxine sur plusieurs poisons. Ceux dont je viens de parler nous montrent, je crois, sous un aspect nouveau cette question, déjà si attrayante, de la sérum-thérapie.

REVUES ET ANALYSES

SUR LA FIXATION DE L'AZOTE ATMOSPHÉRIQUE

REVUE CRITIQUE

Les questions de symbiose prennent une importance de plus en plus grande dans la physiologie et la médecine. Les lecteurs des *Annales* les ont vues apparaître dans les travaux de Vaillard et de ses collaborateurs sur le tétanos, de Roux et de ses collaborateurs sur la diphtérie, de Metchnikoff sur le choléra. Il est clair qu'elles s'étendront à d'autres domaines, et probable qu'elles envahiront le champ presque entier de la pathologie, car rares sont les maladies qui ne mettent en jeu qu'une seule action microbienne, et dans lesquelles on ne soit pas en droit de soupçonner des phénomènes de symbiose ou d'association. L'influence si manifeste de la réceptivité individuelle n'a peut-être pas d'autre explication. Physiologiquement, deux individus de la même espèce doivent se ressembler et réagir de même. Les différences ne peuvent provenir que de la symbiose de ces êtres avec des êtres différents, qui habitent le plus ordinairement le canal digestif, et qui, en imprimant à la digestion des mêmes aliments des allures différentes, habituent les cellules de leur hôte à des nourritures variables, qu'elles traduisent par une résistance plus ou moins grande vis-à-vis des influences utiles ou nocives. Semblables par nature, nous devenons ainsi dissemblables par fonctionnement, et voilà peut-être un des points où se révèle l'importance de la formule que je ne cesse d'opposer aux théories qui admettent une digestion normale et physiologique : *Il n'y a pas de digestion, il y a des digestions*, parce que les interventions microbiennes qui en font partie varient d'un individu à l'autre².

4. Je voudrais évoquer à ce sujet un souvenir personnel, qu'on me permettra d'autant plus de citer qu'il n'est pas à l'honneur de mon courage. Lorsque M. Metchnikoff faisait les expériences sur le choléra dont il a rendu compte dans le t. VII de ces *Annales*, plusieurs médecins et diverses personnes de son laboratoire, entraînés par son exemple et celui de M. Rochefontaine, celui de M. de Pettenkofer, etc., avaient absorbé des cultures virulentes du vibron de Koch sans en ressentir aucun effet bien fâcheux. Je n'ai jamais suivi ces bons exemples. Je me disais qu'en raison des digestions différentes de chacun des expérimen-

Quoi qu'il en soit, nous voilà en présence de questions nouvelles, plus complexes que celles que nous avons étudiées jusqu'ici. La physiologie d'un microbe est déjà difficile à écrire : que sera-ce lorsqu'il y aura dans un même milieu deux microbes dont les actions physiologiques s'influencent mutuellement. Il n'est pas inutile, dans cet ordre d'idées, et pour rassembler sur ces questions le plus de lumière possible, de passer en revue quelques-uns des phénomènes de symbiose que la science a déjà enregistrés et appris à connaître. Il m'a paru qu'on pouvait essayer une synthèse intéressante en examinant les divers modes de fixation de l'azote atmosphérique dans la végétation.

Le mot de symbiose a été prononcé dès l'origine à propos de la fixation de l'azote par les nodosités des racines de légumineuses, au sujet desquelles nous avons publié, il y a cinq ans (V. t. III, p. 82) une *Revue critique*. Ces nodosités avaient été décrites en 1687 par Malpighi, et Woronin, en 1866, y avait découvert des formes allongées ou renflées aux extrémités, qu'il avait considérées comme pathologiques; de Vries, au contraire, en 1877, y avait vu des réserves nutritives, physiologiquement produites par la plante mère. Mais s'il en était ainsi, on pouvait se demander pourquoi tous les pieds n'en possédaient pas, et, à cette question si naturelle, de Vries ne faisait pas de réponse. C'est Hellriegel qui, après avoir vu, dans un même vase de culture artificielle en terre stérile, prospérer les pieds de légumineuses qui portaient des nodosités, et rester chétifs les pieds qui n'en avaient pas, eut la première idée d'une relation entre l'absorption de l'azote et la présence des nodosités. Pour arriver à la notion de symbiose, que fallait-il de plus ? montrer que la matière de ces nodosités était inoculable, et avait ainsi toutes les propriétés d'un être vivant. C'est là l'idée maîtresse du fameux mémoire qu'il a consacré, avec Wilfarth, à la fixation de l'azote atmosphérique par les légumineuses.

Toutefois, même après ce mémoire, la notion de symbiose restait encore très vague. Ce qui était bien démontré, c'était que la fixation de l'azote résultait de la coexistence du développement simultané de la bactérie et de la plante. Mais comment se faisait cette fixation. La plante, à elle seule, en était incapable. La bactérie, quand on eut réussi à la cultiver seule, s'en montra également incapable, ou du moins les seules expériences, dues à M. Beyerinck, dans lesquelles on

tateurs, ce qui avait réussi à l'un pouvait ne pas réussir à l'autre, et je me demandais même, avec un peu d'anxiété, si je devais décourager les savants qui marchaient dans cette voie, en leur montrant ses dangers possibles, ou au contraire laisser librement la science étendre ses conquêtes. J'ai eu raison de me taire, puisque M. Metchnikoff est arrivé à établir, au sujet des associations microbiennes dans le choléra, une notion beaucoup plus claire que celles que j'avais dans l'esprit, et dont on pourra tirer des indications thérapeutiques.

ait pu constater une absorption d'azote, la laissaient singulièrement douteuse. Comment la plante et la bactérie unies pouvaient-elles faire ce qui n'était au pouvoir ni de l'une ni de l'autre, quand elles étaient séparées. La science a tâtonné longtemps dans cette direction. Elle a montré que le tissu des nodosités était plus riche en azote que le reste de la plante, que ce n'était pas au moment de leur formation, mais au moment de leur destruction que ces nodosités rendaient service à leur hôte, qu'à ce moment les bacilles qui avaient formé la nodosité étaient dégénérés, et avaient pris des formes renflées et volumineuses, remplies d'un protoplasma réfringent, qu'on appelle des bactéroïdes, et que la plante trouvait dans ces bactéroïdes l'azote assimilable dont elle avait besoin. Je résume en ces quelques mots ce qu'il y a de plus net et de mieux démontré dans l'histoire déjà touffue des nodosités des légumineuses. Il semble bien en résulter que c'est le bacille qui assimile l'azote. Mais la question reste la même : quelles sont les conditions et le mécanisme de cette fixation ? et pourquoi le bacille semble-t-il avoir besoin de la plante pour la réaliser ?

Pour trouver une réponse à cette question, il faut regarder du côté des expériences de M. Winogradsky, sur les organismes fixateurs d'azote. Ce savant est parti, comme on sait, d'un point de vue tout autre que ses prédécesseurs. S'il y a, s'est-il dit, dans le sol, des bactéries capables à elles seules de fixer l'azote atmosphérique, comme l'a dit le premier M. Berthelot, elles doivent pouvoir vivre et se cultiver dans des milieux totalement débarrassés d'azote combiné. L'expérience lui a montré qu'il y en avait en effet de telles ; il les a isolées avec son habileté ordinaire, et il a constaté, comme fait assez imprévu, que si elles pouvaient se passer de nourriture azotée autre que l'azote de l'air, il leur fallait en échange de grandes quantités de nourriture hydrocarbonée. Elles détruisent beaucoup de sucre pour assimiler peu d'azote.

Mais ici, il faut distinguer. Le microbe fixateur d'azote, isolé par M. Winogradsky, est anaérobie. S'il peut se développer au contact de l'oxygène présent dans le sol, c'est qu'il trouve à côté de lui des êtres aérobies lui créant une atmosphère réductrice, et prenant évidemment leur part des matériaux nutritifs qu'ils rencontrent. Le rapport entre l'azote assimilé et le sucre disparu doit donc dépendre des conditions d'aération. Mais, chose singulière, ce rapport varie au rebours de ce qu'on pouvait croire ; on pouvait s'attendre à le voir diminuer, lorsque le microbe fixateur vit à côté d'autres microbes qui brûlent le sucre sans fixer d'azote. Il augmente au contraire dans ces conditions. Le rapport entre l'azote assimilé et le sucre disparu dépend des conditions d'aération. Il y a 2,5 à 3 d'azote assimilé pour 1000 de sucre détruit quand l'aération est complète ; 2 à 2,5 quand l'aération

est faible; 1,4 en culture anaérobie en présence de l'azote pur. Cela témoigne que l'azote n'est pas un aliment de prédilection pour la plante, puisqu'elle en garde d'autant moins, pour la même quantité de sucre détruit, qu'on le lui donne plus pur, ou, ce qui revient au même, qu'elle a besoin, pour absorber la même quantité d'azote, de détruire d'autant plus de sucre qu'on lui supprime plus le contact de l'oxygène et des êtres qui le consomment. On voit poindre, ici, une nouvelle question de symbiose encore trop confuse pour que nous insistions.

Legain d'azote dépend non seulement du degré d'aération, mais encore du rapport entre le glucose alimentaire et la quantité d'azote ammoniacal qu'il faut introduire dans le mélange nutritif pour commencer la culture. Ce rapport doit être plus grand que 150 pour qu'il y ait gain d'azote. S'il y a trop d'azote ammoniacal, l'azote gazeux n'est plus absorbé.

En somme, nous voyons qu'une bactérie capable d'absorber l'azote ne le peut qu'à de certaines conditions assez étroites, dont nous connaissons quelques-unes : 1^o il faut que le milieu de culture soit aéré; 2^o il faut qu'il y ait une matière alimentaire à détruire en quantités notables, égalant au minimum 350 fois le poids de l'azote assimilé dans le cas du glucose et de la bactérie de M. Winogradsky ¹; 3^o le poids du sucre doit être supérieur à 150 fois le poids de l'azote ammoniacal du milieu. Une étude plus approfondie révélera sans doute d'autres conditions de succès : celles-ci suffisent pour qu'on puisse comprendre que la bactérie des légumineuses soit capable d'absorber de l'azote dans de certaines conditions de nutrition et pas dans d'autres, sur la plante et pas à l'extérieur, qu'elle n'ait manifesté aucune puissance d'absorption dans les premières expériences de M. Beyerinck, et qu'elle en ait montré une, faible il est vrai et encore douteuse, dans les dernières, faites en lui fournissant un milieu nutritif plus approprié que dans les précédents essais. Enfin l'énormité de la consommation de l'aliment hydrocarboné, comparé au poids d'azote fixé, nous amène à croire que si la bactérie des légumineuses rend en effet à la plante le service de lui préparer de l'azote assimilable aux dépens de l'azote de l'air, elle lui emprunte en échange la matière hydrocarbonée que la plante fabrique aux dépens de ses organes verts. Dans ce cas, la symbiose, réduite à ses éléments essentiels, a donc la formule

1. En présence de ce chiffre élevé, on a pu se demander si l'azote combiné dont M. Winogradsky observait l'apparition dans ses cultures, et qu'il attribuait à l'absorption de l'azote gazeux, ne proviendrait pas de l'azote organique que tous les sucres contiennent, et dont il est à peu près impossible de les débarrasser, même au prix de nombreuses cristallisations. Il est difficile de tomber au-dessous de 0^{mg},3 d'azote pour 1 gramme de sucre ou de 3/10000. Mais ce chiffre est dix fois plus faible que la proportion entre l'azote fixé et le sucre détruit dans les expériences de M. Winogradsky. Et d'ailleurs, ce savant a toujours fait des essais à blanc, propres à le mettre en garde contre cette cause d'erreur ou d'illusion.

suivante : la plante et la bactérie prennent dans l'air, l'une, l'aliment hydrocarboné sous forme d'acide carbonique, l'autre l'aliment azoté sous forme d'azote, et elles échangent leurs produits.

Il ne serait pas difficile de signaler, dans les faits déjà nombreux publiés au sujet des bactéries des légumineuses, des notions en rapport avec cette conception générale du phénomène de la symbiose. Nous retrouverions l'utilité de l'aération pendant la culture, la nécessité reconnue d'une petite quantité d'azote à l'origine, l'inutilité d'une dose plus grande, le caractère nocif d'une dose exagérée. De même, en se tournant du côté des bactéries du sol, on pourrait trouver dans les travaux de M. Berthelot, de M. Frank, de MM. Gautier et Drouin, des faits d'accord avec ceux dont M. Winogradsky a fait la synthèse : l'utilité d'une certaine dose d'azote initiale, les inconvénients d'une dose trop élevée, la nécessité d'une certaine quantité de matière organique hydrocarbonée combustible. Peut-être pourrait-on tirer de là l'explication de quelques-unes des irrégularités ou de quelques-uns des faits contradictoires relevés par ces savants et qui laissaient l'opinion indécise. Mais ce serait forcer la note que d'appliquer, aux bactéries des légumineuses ou à d'autres, des notions fournies par les bactéries de Winogradsky. Tout ce que je voulais faire, c'est d'éveiller des idées de comparaisons, et d'indiquer la voie dans laquelle on a des chances de trouver la solution des difficultés pendantes. Si je ne me trompe, la pathologie des associations microbiennes a elle-même à tirer des lumières de ces rapprochements, tellement naturels qu'il faut s'étonner qu'ils n'aient pas encore été faits.

II

Nous allons en retrouver de la même nature en arrivant à la fixation de l'azote atmosphérique par les algues, telle qu'elle a été mise en lumière par les travaux de MM. Schloesing fils et Laurent. Comme celles de MM. Hellriegel et Wilfarth, ces expériences diffèrent des expériences antérieures de M. Berthelot en ce que la fixation de l'azote s'y est faite dans les plantes, et non dans la masse du sol. Mais si, comme celles de M. Hellriegel et Wilfarth les expériences de MM. Schloesing fils et Laurent sont probantes au point de vue de la réalité de la fixation, elles restent aussi muettes sur la question de mécanisme.

Dans leurs essais, les algues qui étaient intervenues étaient un mélange d'espèces; fait plus grave, elles n'étaient jamais débarrassées de bactéries. C'était cet ensemble complexe qui avait été présent partout où il y avait eu fixation d'azote. A la vérité, les algues semblaient nécessaires à la manifestation du phénomène, car lorsqu'on empêchait leur végétation en maintenant la culture à l'obscurité, comme l'avait

fait Frank, ou en couvrant la culture d'une couche de sable fin, comme MM. Schloesing fils et Laurent, on n'avait aucune fixation, alors qu'il s'en produisait une dans le même milieu, lorsque les algues pouvaient s'y implanter. Mais de ce que les algues semblaient nécessaires, il n'en résultait pas qu'elles fussent seules actives, de même qu'il ne résultait pas de ce que les bactéries ne fixaient pas d'azote en l'absence des algues, qu'elles ne fussent pas nécessaires quand les algues étaient là. Deux êtres vivant en symbiose peuvent faire, unis, ce dont ils sont incapables quand ils sont séparés. Rien ne disait que dans des milieux pauvres comme ceux qu'il faut employer dans de pareilles expériences, la bactérie ne puisse vivre que si l'algue lui fournit constamment l'aliment organique qu'elle fabrique constamment aux dépens de la lumière et de l'acide carbonique de l'air, et cette explication avait pour elle des arguments de fait et des arguments théoriques.

En premier lieu, la fixation de l'azote avait été surtout manifeste dans des cultures où les algues avaient été surtout formées d'un mélange de *nostocs*, et formaient à la surface du sol une couche de consistance gélatineuse. Ces *nostocs*, on le sait, sont des algues à paroi épaisse, formée surtout d'un hydrate de carbone voisin des gommes et des celluloses des lichens. Quelques-uns de ces *nostocs* restaient en débris envahis par les bactéries. On retrouvait donc là les caractères et les possibilités d'une association microbienne. Par contre, il y avait eu une expérience où il était développé une algue à peu près pure, le *microcoleus vaginatus*, et où on n'avait pas observé de fixation d'azote. Il se pouvait évidemment que ce résultat fût dû à la nature de l'algue : toutes les bactéries n'ont pas les mêmes propriétés ; on ne peut pas demander à des algues de se ressembler davantage. Mais il pouvait se faire aussi, comme l'avaient finement remarqué MM. Schloesing et Laurent, que « la pureté de la culture soit défavorable à la fixation de l'azote, si, par exemple, celle-ci était le résultat du concours de plusieurs êtres » ; et justement il arrivait que cette culture, où il n'y avait pas eu de fixation, n'avait pas étéensemencée avec de la délayure de terre de jardin qu'avaient au contraire reçue les cultures ayant fixé de l'azote gazeux.

Pour résoudre la difficulté, il y a un moyen, c'est d'ensemencer, dans un milieu assez pauvre en matière organique pour que les bactéries de M. Winogradsky ne puissent intervenir, une ou plusieurs algues pures, de voir si à elles seules elles fixent de l'azote, et, si elles n'en fixent pas, de chercher si elles en fixent lorsqu'elles sont associées à des bactéries banales du sol. C'est ce qu'a fait M. Kossowitch¹, mais non sans rencontrer quelques difficultés.

1. Bot. Zeitung : Originalabhandlungen, 1^{re} p. fasc. V. 1894.

La plus grande vient de ce que la culture des algues à l'état de pureté n'est pas chose commode, même après les travaux de M. Beyerinck ¹. Les algues sont très sensibles au changement de milieu, souffrent de toute transplantation, aiment à être serrées les unes contre les autres, et ne se prêtent pas à la séparation des espèces; ce sont en apparence des plantes très sociables, aimant le contact d'autres espèces. On connaît leur association dans les lichens : dans les vases de culture elles se développent plus abondamment au contact des bactéries. Leur isolement et leur purification sont difficiles. M. Kossowitch est pourtant arrivé à en isoler une espèce, voisine du *cystococcus* (Nørgeli) et du *chlorella vulgaris* (Beyerinck), qu'il a pu cultiver dans des flacons d'Erlenmeyer, sur une couche de sable, imbibée d'une solution nutritive contenant, par litre : 0^{gr},25 de phosphate bibasique et 0^{gr},25 de phosphate tribasique de potasse, 0^{gr},37 de sulfate de magnésie, 0^{gr},2 de chlorure de sodium, et des traces de phosphate de fer et de sulfate de chaux.

Quand on n'ajoute pas de nitrate, la culture est impossible, alors même qu'on y introduit du sucre. En revanche, quand on introduit du nitrate, et M. Kossowitch employait du nitrate de chaux, la culture se fait; la surface et l'intérieur du sable se recouvrent d'une couche verte qui grandit d'abord à vue d'œil, puis s'arrête au bout de quelques semaines. Il va sans dire qu'on fait circuler dans le matras un courant d'air privé d'ammoniaque, mais contenant un peu d'acide carbonique. Quand la culture semble s'arrêter, on lui donne un nouvel essor en y ajoutant du nitrate de chaux. Par contre, l'addition des autres sels nutritifs est alors sans effet. Cela prouve que la plante a besoin d'azote combiné et ne s'accommode pas d'azote libre. On constate en effet que la quantité d'azote contenue dans la culture ne varie pas, dans les limites d'erreur du procédé de mesure. Il faut donc conclure, avec M. Kossowitch, que « dans ces cultures, le *cystococcus*, en l'absence d'autres organismes, n'a pas fixé d'azote libre ». Cette conclusion résulte de douze expériences faites avec des quantités variables de nitrate de chaux, et avec ou sans addition de sucre, qui semble plutôt défavorable que favorable à la culture des algues, quand elles sont pures. On a ajouté dans 2 cas des bactéries des nodosités de pois, sans que rien ait été changé au résultat.

Il en est tout autrement quand on ajoute au sable de la délayure de terre de jardin, et qu'on laisse envahir la culture par des bactéries banales, et d'autres espèces d'algues que le *cystococcus* ensemencé. Voici un tableau résumant les 10 expériences de M. Kossowitch. Les 10 matras étaient partagés en 5 groupes de 2, dont un recevait à l'ori-

1. Bot. Zeitung, 1890, p. 625.

gine 0^{gr},75 de dextrose, et dans la suite 1 gramme de dextrose en 5 fois. L'autre matras ne recevait pas de sucre. L'ensemencement était différent d'un groupe à l'autre, et le tableau donne l'indication des espèces qu'on y relevait au microscope, la culture faite. Il donne aussi les quantités d'azote trouvées à la fin de la culture. La quantité d'azote originaire était de 2^{mgr},7.

Groupes.	Êtres développés.	Sans sucre.	Avec sucre.
1	<i>Cystococcus, phormidium</i> , bactéries du sol, mucédinées.....	7.4 ^{mgr}	9.5 ^{mgr}
2	<i>Cystococcus</i> et bactéries.....	3.1	8.1
3	<i>Stichococcus</i> et bactéries.....	2.3	2.7
4	Nostoc, grosses algues rondes, <i>Scenedesmus</i> , bactéries du sol.....	?	19.1
5	Nostoc, forme analogue au <i>cylindrospermum</i> , bactéries.....	8.8	25.4

Sauf dans un cas, où la fixation a été nulle, il y a donc eu de l'azote fixé dans toutes ces expériences, et même en proportions parfois assez grandes. Il y en a eu dans les matras sans sucre, bien qu'elle ait été plus marquée dans les matras avec sucre, mais même dans ces derniers, il ne faut pas penser à l'intervention des bactéries de M. Winogradsky, du moins avec les propriétés que nous a fait connaître ce savant, car la proportion d'azote fixé, pour 1 gramme de sucre disparu, est beaucoup plus grande dans les expériences de M. Kossowitch où elle dépasse 2 0/0, au lieu du maximum de 4/1000 réalisé par M. Winogradsky. De plus nous retrouvons encore ici cette fixation plus abondante dans le cas des nostocs, qui, dans les expériences de M. Kossowitch comme dans celles de MM. Schlœsing et Laurent, formaient une couche gélatineuse à la surface et dans l'épaisseur de la culture.

Nous voilà donc conduits à cette conclusion que c'est l'association des algues et des bactéries, ou, si on veut, l'association de certaines algues et de certaines bactéries qui préside à la fixation de l'azote gazeux. Mais la façon dont a été ordonné notre exposé éclaire en outre la question de mécanisme, et conduit à penser que la symbiose dans ce cas se fait comme dans le cas des bactéries des nodosités des légumineuses, et met en jeu le même rouage que les bactéries de Winogradsky. L'algue fabrique de la matière alimentaire que la bactérie consomme, et dont la destruction lui fournit l'énergie nécessaire à la fixation et à l'organisation de l'azote gazeux de l'atmosphère.

Il est vrai que l'azote et l'oxygène peuvent se combiner théoriquement pour donner de l'acide azotique, surtout en présence de l'eau, parce que cette oxydation de l'azote et l'hydratation de l'acide formé dégagent de la chaleur. Mais il reste encore douteux que cette oxyda-

tion puisse se faire par voie microbienne, sans destruction concomitante d'une énergie étrangère, les deux phénomènes d'organisation et de destruction étant mis en rapport et en état de dépendance mutuelle dans le protoplasma de la cellule vivante. Au moins peut-on remarquer, à l'appui de notre explication, qu'elle laisse aux algues vertes et aux bactéries le rôle qu'on leur connaît : aux algues le rôle de producteur de matière organique aux dépens de l'acide carbonique et de la lumière solaire, aux bactéries leur rôle d'agent de destruction, ayant besoin de brûler de grandes quantités de matière pour fabriquer celle qui est nécessaire à la construction de leurs tissus et à l'entretien de leur protoplasma.

Les trois grands phénomènes de la fixation de l'azote gazeux que nous venons d'examiner ont donc, de ce fait, une formule commune. Ils exigent tous la consommation d'une énergie étrangère. Ils se rapprochent, sous ce point de vue, de la fixation de l'azote gazeux par des effluves électriques, mise en lumière par M. Berthelot. Par contre ils se séparent d'autres expériences de ce savant, les premières qui aient été publiées au sujet de la fixation de l'azote gazeux par voie microbienne, et dans lesquelles la fixation de l'azote gazeux n'a été accompagnée de la destruction d'aucune matière organique, car le sol des expériences, formé de kaolin ou de sable lavé, n'en renfermait que des traces ; ce sont là les phénomènes que M. Berthelot appelle avec justesse les phénomènes de fixation de l'azote par le sol. En recommençant ces expériences, M. Schloësing n'en a pas retrouvé les résultats. Mais cela ne prouve rien au point de vue théorique. Il se peut, si les bactéries interviennent, qu'elles n'aient pas été les mêmes dans les terres de M. Berthelot et dans celles de M. Schloësing. Les conditions du phénomène ne sont pas encore établies. Toutefois, la formule de cette fixation nous apparaît d'ores et déjà comme différente de celle des cas qui précèdent, et nous pouvons dès lors la laisser pour le moment en dehors de notre cadre, dans lequel nous nous proposons surtout de faire l'étude des phénomènes de symbiose.

En résumé, nous voyons deux grands phénomènes naturels s'expliquer par un échange de bons procédés entre une plante sans chlorophylle et une plante verte, celle-ci fabriquant de la matière organique hydrocarbonée dont elle fait part à celle-là, qui, en retour, lui fournit le composé azoté dont la plante verte a besoin ; et c'est ainsi qu'à côté de la loi : « Mangez-vous les uns les autres » qui est la grande loi conservatrice de la nature, nous trouvons la loi plus douce : « Aidez-vous les uns les autres ». Mais elle est plus rarement en jeu, et il semble vraiment que son fonctionnement soit plus délicat.

E. DUCLAUX.

Le Gérant : G. MASSON.
